

УЧЕБНИКИ И УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ
ДЛЯ СТУДЕНТОВ ВЫСШИХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ

Практикум по физиологии растений

Под редакцией профессора
Н. Н. Третьякова

Допущено Главным управлением
высших учебных заведений при Го-
сударственной комиссии Совета Ми-
нистров СССР по продовольствию и
закупкам в качестве учебного посо-
бия для студентов высших учебных
заведений по агрономическим специ-
альностям.

3-е издание, переработанное
и дополненное

Москва ВО «Агропромиздат» 1990



ББК 41.2

П69

УДК 581.1 (076.5)

Редактор *Е. В. Кирсанова*

Рецензенты: доктор биологических наук
З. Д. Баранникова, кандидаты биологических наук
В. М. Бурень и *Д. И. Лаврентович*

Практикум по физиологии растений / Н. Н. Третьяков, Т. В. Карнаухова, Л. А. Паничкин и др. — 3-е изд., перераб. и доп. — М.: Агропромиздат, 1990. — 271 с.: ил. — (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений).

ISBN 5—10—001653—1

Показаны методы изучения физиологии растительной клетки, водного обмена, фотосинтеза, дыхания, минерального питания, обмена веществ, роста и развития, устойчивости растений к неблагоприятным условиям. Третье издание (второе вышло в 1982 г.) дополнено сведениями о способах оценки состояния растений в полевых условиях.

* Для студентов вузов по агрономическим специальностям.

П 3704010000—372 209—90
035(01)—90

ББК 41.2

ISBN 5—10—001653—1

© Издательство «Колос», 1982
© ВО «Агропромиздат», 1990,
с изменениями

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Живая клетка представляет собой открытую биологическую систему, обменивающуюся с окружающей средой веществом, энергией и информацией.

Снаружи клетка покрыта оболочкой, основу которой составляют целлюлоза и пектиновые вещества. Клеточная стенка выполняет защитно-изолирующую функцию, а также участвует в поглощении, выделении и передвижении веществ. Вследствие гидрофильности компонентов клеточная стенка насыщена водой и играет роль буфера в водоснабжении клетки.

Основой структуры протопласта служат клеточные мембраны. Они состоят в основном из белков и липидов. Молекулы этих веществ образуют упорядоченную структуру благодаря вандер-ваальсовым, водородным и ионным химическим связям. Все мембраны обладают избирательной проницаемостью.

Поверхностная мембрана — плазмалемма изолирует клетку от окружающей среды. Органеллы цитоплазмы имеют свои поверхностные мембраны. Вакуоль ограничена внутренней мембраной цитоплазмы — тонопластом. Таким образом, мембраны осуществляют компартментацию клетки, т. е. разделение ее на отдельные участки — компартменты, в которых поддерживается постоянство среды — гомеостазис. Мембраны составляют также внутреннюю структуру таких органелл, как хлоропласты и митохондрии, увеличивая поверхность, на которой протекают важнейшие биохимические и биофизические процессы.

Мембраны выполняют следующие функции: регуляцию поглощения и выделения веществ; организацию ферментных и пигментных комплексов, участвующих в фотосинтезе, дыхании, синтезе различных веществ; передачу биоэлектрических сигналов по клеткам и тканям

живого организма. Функции растительной клетки в целом определяются согласованной деятельностью отдельных органелл.

Диаметр ядра составляет 10...30 мкм. В ядре хранится наследственная информация, заключенная в специфических структурах ДНК, оно также регулирует все жизненные процессы в клетке. Все клетки одного организма тотипотентны. Биотехнология успешно реализует это свойство при получении обеззараженного посадочного материала, производстве активных химических веществ и клеточной селекции. С ядерной мембраной связана эндоплазматическая сеть (э.п.с.). Ограниченные мембранами каналы э.п.с. пронизывают всю цитоплазму и проникают в соседние клетки через плазмодесмы. Функции э.п.с. — транспорт веществ и передача сигналов. На поверхности грагулярной, или шероховатой, э.п.с. располагаются «фабрики белка» — рибосомы, состоящие из белка и РНК, длина которых варьирует в пределах 10...30 нм.

Для растительной клетки характерно присутствие пластид. Важнейшие пластиды — это хлоропласты. Диаметр хлоропластов составляет 5...10 мкм. Они осуществляют трансформацию световой энергии в химическую. Другой важнейший энергетический процесс (синтез АТФ за счет энергии окисления) происходит в митохондриях. Они представляют собой овальные или палочковидные структуры длиной 1...2 мкм. Система канальцев и цистерн (диктиосом), ограниченных однослойной мембраной, составляет аппарат Гольджи, основная функция которого — внутриклеточная секреция веществ, необходимых для построения клеточной оболочки и др. В округлых тельцах — лизосомах сконцентрированы гидролитические ферменты. С помощью сферосом идет синтез липидов.

Взрослая растительная клетка имеет большую вакуоль с водным раствором органических и минеральных веществ. Концентрация этих веществ в клеточном соке и степень их диссоциации определяют потенциальное осмотическое давление клетки — ее способность всасывать воду.

Вода поступает в клетку извне в результате разности химических потенциалов воды в клетке и окружающем растворе. Разность химического потенциала воды в клетке (μ_w) и химического потенциала чистой воды (μ_w^0),

отнесенную к парциальному объему воды в клетке (V_w), называют водным потенциалом (ψ_w):

$$\psi_w = \frac{\mu_w - \mu_w^0}{V_w}.$$

Химический потенциал чистой воды всегда выше химического потенциала воды в клетке, поэтому значение водного потенциала всегда отрицательно. По величине водного потенциала определяют сосущую силу клетки, т. е. ее способность поглощать воду в каждый конкретный момент времени. Сосущая сила клетки меняется в зависимости от степени насыщения клетки водой — ее тургора.

Наибольшей сосущей силой клетка обладает при полном отсутствии тургора. В этот момент способность клетки насасывать воду определяется ее потенциальным осмотическим давлением. Тургорное давление — это сила, с которой насыщенное водой содержимое клетки давит на ее стенки. В состоянии полного насыщения клетки водой тургорное давление полностью уравнивает осмотическое, и клетка перестает поглощать воду. Водный потенциал в этот момент равен нулю.

Осмотическое движение воды в клетку — пассивный процесс, не требующий затрат энергии. Минеральные соли поступают через клеточные мембраны против электрохимического градиента при помощи специфических белков-переносчиков с затратой энергии АТФ.

Под действием повреждающих агентов, достигших пороговой силы, в клетках происходит изменение нативной (прижизненной) структуры белков — денатурация. В зависимости от силы и времени действия агента денатурация может быть обратимой и необратимой. Независимо от природы агента при повреждении в клетке возникает комплекс неспецифических ответных реакций: уменьшение степени дисперсности цитоплазмы (помутнение); повышение вязкости; увеличение проницаемости мембраны (выход веществ из клетки); повышение сродства к красителям у цитоплазмы и ядра; смещение рН среды в кислую сторону; уменьшение мембранного потенциала. Каждый из этих показателей может служить критерием при установлении повреждения клетки и использоваться для диагностики ее устойчивости к неблагоприятным условиям среды.

Работа 1. ВЛИЯНИЕ АНИОНОВ И КАТИОНОВ СОЛЕЙ НА ФОРМУ И ВРЕМЯ ПЛАЗМОЛИЗА

Вводные пояснения. Плазмолиз — это процесс отставания цитоплазмы от стенок клетки, помещенной в раствор с большей концентрацией солей, чем концентрация клеточного сока (гипертонический раствор). В ходе плазмолиза очертания поверхности цитоплазмы меняются. Вначале ее поверхность будет вогнутой (*вогнутый плазмолиз*), затем становится выпуклой (*выпуклый плазмолиз*).

Временем плазмолиза называют период с момента погружения ткани растения в раствор плазмолитика до наступления выпуклого плазмолиза. Этот показатель может характеризовать вязкость цитоплазмы: чем больше время плазмолиза, тем выше вязкость цитоплазмы. Время плазмолиза определяют при изучении действия солей на цитоплазму.

Порядок работы. Срез эпидермиса с выпуклой поверхности пигментированной чешуи луковицы помещают в каплю раствора испытуемой соли, накрывают покровным стеклом и сейчас же микроскопируют. Следят за сменой форм плазмолиза. Определяют время плазмолиза в каждой соли. Результаты опыта записывают по форме (табл. 1).

1. Влияние анионов и катионов солей на форму и время плазмолиза

Вариант	Соль	Концентрация раствора, моль/л	Время погружения ткани в раствор, мин	Время наступления выпуклого плазмолиза, мин	Длительность плазмолиза, мин
1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,7			
2	KNO_3	1,0			
3	KCNS	1,0			

После изучения полученных результатов делают выводы о влиянии катионов и анионов на вязкость цитоплазмы.

Материалы и оборудование. Луковица с пигментированными чешуями, растворы солей: 0,7 М $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1 М KNO_3 , 1 М KCNS . Микроскопы, предметные и покровные стекла, бритвы.

Работа 2. НАБЛЮДЕНИЕ КОЛПАЧКОВОГО ПЛАЗМОЛИЗА

Вводные пояснения. Колпачковый плазмоллиз возникает при действии гипертонических растворов солей, проникающих через плазмалемму, но не проходящих или очень слабо проходящих через тонопласт. Такие соли вызывают набухание мезоплазмы и изменение ее структуры.

Колпачковый плазмоллиз проявляется в образовании колпачков из набухшей цитоплазмы на узких сторонах вакуоли.

Порядок работы. Срез эпидермиса с выпуклой поверхности пигментированной чешуи луковицы помещают на предметное стекло в каплю 1 М раствора KCNS и накрывают покровным стеклом. Сразу же наблюдают за ходом плазмоллиза сначала при малом, а затем при среднем увеличении.

Зарисовывают одну клетку с хорошо выраженным колпачковым плазмоллизом. На основании наблюдений делают вывод о свойствах цитоплазмы и ее мембран.

Материалы и оборудование. Луковица с окрашенными чешуями, 1 М раствор KCNS.

Микроскопы, предметные и покровные стекла, стеклянные палочки, бритвы.

Работа 3. НАБЛЮДЕНИЕ ПРИЗНАКОВ ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТКИ (ПОВЫШЕНИЕ СРОДСТВА К КРАСИТЕЛЯМ И ОСТРУКТУРИВАНИЕ ЯДРА И ЦИТОПЛАЗМЫ)

Вводные пояснения. Цитоплазма обладает сложной прижизненной структурой, с которой связаны ее свойства и функции. Важнейшее из этих свойств — избирательная проницаемость. Живая цитоплазма не удерживает в себе витальные красители, которые через нее свободно проходят в вакуоль и окрашивают клеточный сок.

После гибели или повреждения клетки красители задерживаются в самой цитоплазме в результате изменений пассивной (прижизненной) структуры белков. Цитоплазма приобретает соответствующую окраску.

Порядок работы. Кусочек эпидермиса чешуи непигментированной луковицы лука выдерживают в слабом растворе нейтрального красного в течение 20 мин. После окрашивания кусочек эпидермиса помещают на предметное стекло в каплю воды, накрывают покровным

стеклом и рассматривают под микроскопом сначала при малом, а затем при среднем увеличении.

У живых клеток вакуоли окрашиваются нейтральным красным в малиновый цвет, цитоплазма и ядро не окрашиваются. У мертвых клеток цитоплазма и ядро окрашиваются этим красителем. Не снимая препарат со столика микроскопа, фильтровальной бумагой отсасывают воду из-под покровного стекла и вводят под него каплю 1 М раствора KNO_3 . После этого наблюдается плазмолиз клеток, накопивших краску в вакуолях, следовательно, клетки живые.

Чтобы проследить за изменениями в клетке при ее повреждении и гибели, применяют сильный яд — аммиак. Из-под покровного стекла KNO_3 отсасывают и заменяют каплей 10%-го раствора аммиака. Окраска среза становится желтой, так как в присутствии аммиака кислая реакция клеточного сока изменилась на щелочную (в щелочной среде нейтральный красный имеет желтый цвет). В погибших под действием аммиака клетках цитоплазма и ядро приобретают видимую в микроскоп структуру и окрашиваются в желто-бурый цвет.

Зарисовывают: живые клетки лука, накопившие нейтральный красный в вакуолях; эти же клетки, плазмолизированные в 1 М растворе KNO_3 ; клетки лука с структурными и окрашенными цитоплазмой и ядром, убитые аммиаком. Делают выводы по результатам работы.

Материалы и оборудование. Луковица лука с белыми чешуями, раствор нейтрального красного (1:1000), 1 М раствор KNO_3 , 10%-й раствор NH_4OH .

Химические стаканы на 100 мл, микроскопы, предметные и покровные стекла, пинцеты, стеклянные палочки.

Работа 4. ДИАГНОСТИКА ПОВРЕЖДЕНИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПО УВЕЛИЧЕНИЮ ЕЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ

Вводные пояснения. Избирательная проницаемость — свойство живой цитоплазмы сохранять постоянство внутриклеточной среды. При повреждении клетки цитоплазма теряет это свойство, и вещества, находящиеся в клеточном соке, свободно выходят наружу. Степень повреждения коррелирует с количеством выделяющихся в водную среду веществ. Таким образом, интенсивность выхода веществ из клетки служит критерием ее повреждения.

Выделившийся из поврежденных клеток пигмент антоциан легко учесть колориметрическим способом.

Порядок работы. Из очищенного корнеплода красной свеклы сверлом диаметром 0,7...0,8 см берут куски цилиндрической формы высотой 4 см. Их тщательно промывают под струей водопроводной воды и помещают по одному в пять пробирок, содержащих по 10 мл различных растворов в соответствии со схемой опыта.

Вариант опыта с кипячением выполняют следующим образом. В колбу с кипящей водой бросают один из приготовленных кусочков. Через 2 мин кусочек вынимают, охлаждают и опускают в пробирку с 10 мл холодной водопроводной воды.

Через 30 мин после начала опыта все пробирки интенсивно встряхивают, кусочки свеклы извлекают и сравнивают количество вышедшего из клеток пигмента в разных вариантах опыта при помощи фотоэлектроколориметра (ФЭК) на синем светофильтре. При этом в контрольную кювету ФЭК наливают тот раствор, действие которого изучают. Интенсивность окраски устанавливают по коэффициенту экстинкции на шкале ФЭК*.

Для наблюдения за состоянием клеток из кусочка свеклы контрольного варианта и варианта с наиболее интенсивным выходом веществ готовят тонкие срезы, помещают их на предметные стекла в каплю 1 М раствора KNO_3 , накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом. Зарисовывают клетки срезов двух вариантов, находящиеся под действием плазмолитика. Результаты опыта записывают по форме (табл. 2).

2. Форма записи результатов

Наименование	Контроль (водопроводная вода)	После кипячения (вод. проводная вода)	Водопроводная вода + 6 капел. хлороформа	30 %-й раствор уксусной кислоты	50 %-й раствор спирта
--------------	----------------------------------	---	--	---------------------------------	-----------------------

Интенсивность окраски раствора (коэффициент экстинкции по шкале ФЭК)

По материалам наблюдений делают выводы о степени повреждения цитоплазмы.

* Определение на фотоэлектроколориметре описано в работе 39.

Материалы и оборудование. Красная свекла, хлороформ, 30%-й раствор уксусной кислоты, 50%-й раствор спирта, 1 М раствор KNO_3 .

Штативы с пятью пробирками, конические колбы, сверла, линейки, пипетки с делениями на 10 мл, предметные и покровные стекла, микроскопы, ФЭК.

Работа 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ СЕМЯН ПО ОКРАШИВАНИЮ ЦИТОПЛАЗМЫ

Вводные пояснения. При повреждении растительной ткани увеличивается сродство цитоплазмы к красителям. На этом основаны методы определения жизнеспособности семян по окрашиванию их зародышей витальными красителями. Жизнеспособными считаются те семена, зародыши которых не окрашиваются.

Порядок работы. Метод Нелюбова. Этим методом устанавливают жизнеспособность семян гороха, фасоли, люпина, конопли и тыквенных.

Берут 10...15 семян гороха, предварительно намачивают в течение 18 ч при 20°C, освобождают от семенной оболочки, помещают в 0,2%-й раствор индигокармина на 2...3 ч при 30°C. Затем краску сливают, промывают семена водой и устанавливают их жизнеспособность.

Семена с неокрашенными корешками и слабо окрашенными семядолями относят к жизнеспособным. Семена с полностью окрашенными корешками и семядолями признают нежизнеспособными.

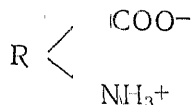
Метод Иванова. Для определения берут десять зерновок пшеницы, предварительно намачивают в воде в течение 10 ч при комнатной температуре, разрезают бритвой вдоль бороздки пополам и помещают на 15 мин в 0,2%-й раствор кислого фуксина или 0,1%-й раствор индигокармина, налитый в стаканчик или бюкс. Краску сливают, промывают семена водой, размещают пинцетом на фильтровальной бумаге и определяют жизнеспособность. У жизнеспособных семян зародыши не окрашены, у мертвых или сильно поврежденных окрашены более или менее интенсивно.

Зарисовывают жизнеспособные и нежизнеспособные семена. По результатам работы делают выводы.

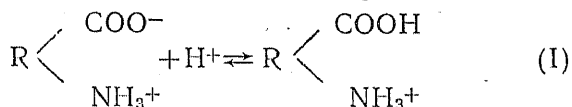
Материалы и оборудование. Семена гороха и пшеницы, 0,2%-й и 0,1%-й растворы индигокармина или 0,2%-й раствор кислого фуксина. Бюксы, пинцеты, фильтровальная бумага, бритвы, пренаровальные иглы.

**Работа 6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ
РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ
КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ**

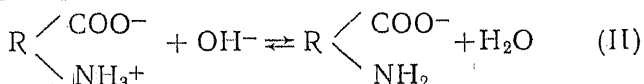
Вводные пояснения. Аминокислоты и белки цитоплазмы — амфотерные вещества. В растворе они диссоциируют и как кислоты, и как основания. Белки и аминокислоты схематично можно представить в следующем виде:



Чем выше концентрация водородных ионов в среде, тем более подавлена кислотная диссоциация, и белок приобретает больший положительный заряд:



Чем больше концентрация гидроксильных ионов, тем в большей степени подавлена основная диссоциация, и белок приобретает больший отрицательный заряд:



При определенной величине pH среды диссоциация по уравнениям I и II подавлена в одинаковой степени. Количество положительных и отрицательных зарядов уравнивается. Амфолит* становится электронейтральным. Данное значение pH среды называют *изоэлектрической точкой* (ИЭТ).

Каждый амфолит имеет свою величину ИЭТ. У белков и аминокислот она зависит от количества свободных кислотных (карбоксильных), основных (аминных) групп. Зная ИЭТ белков, можно судить о соотношении в их составе кислых и основных аминокислот. В тех случаях, когда в растворе амфотерного соединения диссоциация идет по типу основания (в средах с pH ниже ИЭТ), положительный заряд будет связывать анионы. Если диссоциация идет по кислотному типу (в средах с pH выше ИЭТ), отрицательный заряд связывает катионы.

* Молекула амфотерного соединения в состоянии диссоциации.

Для определения изоэлектрической точки растительной ткани применяют кислый краситель эозин, у которого розовой окраской обладает анион, и основной краситель метиленовую синюю (МС), цвет которого обусловлен катионом. При окрашивании амфотерного соединения этими красками и погружении в среды, рН которых ниже ИЭТ, связываются преимущественно анионы эозина. Поэтому раствор приобретает розовую окраску. В среде, где рН выше ИЭТ, амфолит удерживает катион метиленовой синей и окрашивается в синий цвет. В среде с рН, равным ИЭТ, окраска амфолита будет промежуточной между розовой и синей — фиолетовой, так как в этом случае количество отрицательных и положительных зарядов одинаково.

В цитоплазме содержится смесь растворов амфотерных соединений, поэтому переходная зона между розовой и синей окраской будет соответствовать более или менее широкому интервалу рН.

Порядок работы. В бюксах готовят по 10 мл буферных растворов со следующими значениями рН: 2,2; 3,0; 3,6; 5,0; 5,4; 6,0; 7,0; 8,0 (в соответствии с табл. 3).

3. Приготовление буферных растворов с различным рН

Номер пробирки	рН	0,2 М Na_2HPO_4 , мл	0,1 М лимонная кислота, мл
1	2,2	0,20	9,80
2	3,0	2,05	7,95
3	3,6	3,22	6,78
4	5,0	5,15	4,85
5	5,4	5,57	4,43
6	6,0	6,31	3,69
7	7,0	8,23	1,77
8	8,0	9,72	0,28

На расстоянии 0,5 см от кончика корня гороха бритвой делают строго поперечные срезы (не менее 24) и помещают их в фарфоровую чашку с 70 %-м раствором этилового спирта на 5 мин.

В одну фарфоровую чашку наливают 2...3 мл 0,1 %-го раствора эозина, в другую — столько же 0,02 %-й метиленовой синей. Из спирта кисточкой срезы переносят в раствор эозина на 10 мин. Все они окрасятся в розовый цвет. Затем срезы из эозина без промывания поме-

щают в раствор метиленовой синей также на 10 мин; срезы станут синими.

Окрашенные срезы кисточкой переносят в буферные растворы с различной концентрацией водородных ионов по три среза в каждую. В буферных растворах их выдерживают 1...2 ч. Затем срезы вынимают, размещают на предметном стекле в определенном порядке и рассматривают под микроскопом при малом увеличении. В растворах с рН ниже ИЭТ окраска ткани будет розовой; при рН выше ИЭТ — синей. Переход окраски (фиолетовый цвет) будет указывать на то, что рН внешнего раствора соответствует ИЭТ ткани. Изоэлектрическая точка для коры и ксилемы будет неодинакова (переход окраски от розовой к синей будет наблюдаться при разном рН). Следовательно, состав цитоплазмы в клетках этих тканей различен.

Результаты опыта записывают по форме (табл. 4).

4. Окрашка растительной ткани в зависимости от рН буферного раствора

Номер бюкса	рН буферного раствора	Окрашка ткани		ИЭТ	
		кора	ксилема	кора	ксилема
1	2,2				
2	3,0				
3	3,6				
4	5,0				
5	5,4				
6	6,0				
7	7,0				
8	8,0				

Материалы и оборудование. Пророщенные семена фасоли или гороха, 0,1 М раствор лимонной кислоты, 0,2 М раствор Na_2HPO_4 , 0,1%-й раствор эозина, 0,02%-й раствор метиленовой синей, 70%-й раствор этилового спирта.

Лезвия безопасной бритвы, бюксы, фарфоровые чашки, кисточки, препаровальные иглы, микроскопы, предметные и покровные стекла.

Работа 7. НАБЛЮДЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ СВЕТА НА СКОРОСТЬ ДВИЖЕНИЯ ЦИТОПЛАЗМЫ

Вводные пояснения. Во многих растительных клетках хорошо заметно передвижение различных цитоплазматических структур, вызванное спонтанным движением

цитоплазмы. Оно обусловлено метаболизмом и обратимыми изменениями в цитоплазматических белках.

Вместе с током цитоплазмы передвигаются метаболиты и передаются различные сигналы из клетки в клетку. Наличие или отсутствие движения цитоплазмы, изменение его скорости могут указывать на функциональное состояние растительной клетки.

Порядок работы. На предметное стекло в каплю воды помещают лист элодеи, взятый вблизи верхушечной почки с растения, находящегося на рассеянном свете. Накрывают лист покровным стеклом и рассматривают под микроскопом сначала при малом, а затем при среднем увеличении. Окуляр должен быть снабжен окуляр-микрометром. Наблюдают движение хлоропластов в клетках, расположенных рядом со средней жилкой.

Для учета скорости передвижения хлоропластов вращением окуляра совмещают шкалу окуляра-микрометра с направлением движения хлоропластов. Включив секундомер, замечают время, необходимое для прохождения каким-либо одним хлоропластом пути в десять делений окуляра-микрометра. Определение выполняют не менее чем с десятью хлоропластами.

Таким же способом устанавливают скорость движения хлоропластов в листьях элодеи, находящейся в течение 15 мин под светом электролампы (100 Вт)*.

Чтобы выразить скорость движения хлоропластов в микрометрах в секунду, необходимо определить цену деления окуляра-микрометра. На предметный столик помещают микрометрическую линейку и совмещают с направлением шкалы окуляра-микрометра. Совмещают также нулевые точки обеих шкал. Находят соответствующие друг другу линии на шкалах и определяют, сколько делений микрометрической линейки (А) и окуляра-микрометра (В) находится между совмещенными точками. Зная цену деления микрометрической линейки (10 мкм), находят цену деления окуляра-микрометра:

$$C = \frac{10 \text{ мкм} \cdot A}{B}.$$

Зная время, необходимое для прохождения каждым хлоропластом расстояния, равного десяти делениям оку-

* Лампа должна быть удалена от растения на 20...30 см, чтобы исключить перегрев.

ляра-микрометра (10 С мкм), вычисляют скорость движения хлоропласта.

Результаты опыта записывают по форме (табл. 5).

5. Определение скорости движения хлоропластов

Вариант	Время прохождения хлоропластом десяти делений окуляра-микрометра, с										Среднее время, с	Длина проходного отрезка, мкм	Скорость движения хлоропластов, км/с
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			

На рассеянном свете
Под лампой

Материалы и оборудование. Листья элодеи. Микроскопы, предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, окуляры-микрометры, микрометрические линейки, секундомеры, настольные лампы.

Работа 8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО СОКА МЕТОДОМ ПЛАЗМОЛИЗА

Вводные пояснения. Клеточный сок — водный раствор различных органических и неорганических веществ. Потенциальное осмотическое давление зависит от числа частиц, находящихся в этом растворе, т. е. от концентрации и степени диссоциации растворенных молекул. Потенциальное осмотическое давление выражает максимальную способность клетки всасывать воду. Величина этого показателя указывает на возможность произрастания растения на почвах различной водоудерживающей силы. Повышение осмотического давления клеточного сока при засухе служит критерием обезвоживания растений и необходимости полива.

Данный метод основан на подборе такой концентрации наружного раствора, которая вызывает самый начальный (уголковый) плазмолиз в клетках исследуемой ткани. В этом случае осмотическое давление раствора примерно равно осмотическому давлению клеточного сока. Такой раствор называют изотоническим.

Порядок работы. В бюксах готовят по 10 мл 0,7 М; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 М растворов сахарозы путем разбавления 1 М раствора дистиллированной водой. Растворы тщательно перемешивают. Бюксы закрывают крыш-

ками, чтобы предотвратить испарение, и ставят в ряд по убывающей концентрации.

Лезвием безопасной бритвы делают тонкие срезы с выпуклой поверхности чешуи лука размером примерно 25 мм² из среднего, хорошо окрашенного участка.

В каждый бюкс, начиная с высокой концентрации, с интервалом в 3 мин опускают по два-три среза. Через 30 мин после погружения срезов в первый бюкс исследуют их под микроскопом. Затем каждые 3 мин наблюдают под микроскопом срезы из последующих бюксов. При этом достигается равная продолжительность пребывания срезов в растворах плазмолитиков. Срезы рассматривают под микроскопом в капле раствора из того бюкса, откуда они были взяты.

Определяют степень плазмолиза клетки в каждом растворе и находят изотоническую концентрацию как среднее арифметическое между концентрацией, при которой плазмолиз только начинается, и концентрацией, которая уже не вызывает плазмолиза.

Результаты опыта записывают по форме (табл. 6).

6. Определение потенциального осмотического давления

Концентрация растворов сахарозы, мг/мл	На 10 мл раствора		Продолжительность пребывания среза в растворе		Степень плазмолиза	Изотоническая концентрация, моль/л	Потенциальное осмотическое давление, кПа
	1 М раствора сахара, мл	воды, мл	время погружения	время наблюдения			
0,7	7	3					
0,6	6	4					
0,5	5	5					
0,4	4	6					
0,3	3	2					
0,2	2	8					

Величину потенциального осмотического давления (в кПа) рассчитывают по формуле:

$$\Pi = 101,3RTci,$$

где R — газовая постоянная; T — абсолютная температура по Кельвину (273 °C + комнатная); c — изотоническая концентрация в молях; i — изотонический коэффициент Вант-Гоффа; 101,3 — множитель для перевода атмосфер в килопаскали.

Коэффициент Вант-Гоффа характеризует ионизацию растворов и для неэлектролитов (сахароза) равен 1.

Материалы и оборудование. Луковица лука с пигментированными чешуями, 1 М раствор сахарозы.

Безопасные бритвы, микроскопы, предметные и покровные стекла, бюксы, градуированные пипетки на 10 мл, кисточки, препаровальные иглы, часы, фильтровальная бумага.

Работа 9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КЛЕТОЧНОГО СОКА И ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Вводные пояснения. Рефрактометрический метод позволяет быстро и точно определить концентрацию клеточного сока и потенциальное осмотическое давление, поэтому он очень удобен для работы в поле. Метод основан на учете показателя преломления света клеточным соком.

Порядок работы. При помощи ручного пресса получают сок из двух-трех листьев исследуемых растений, предварительно завернутых в кусочек марли. В качестве опытных вариантов интересно взять растения, относящиеся к трем различным группам — мезофитам, гигрофитам и ксерофитам.

Если ручного пресса нет, растительную массу измельчают в ступке, переносят на двойной слой марли и отжимают сок. Определение можно вести на любом рефрактометре.

Опишем работу с рефрактометром 06-101А. На нижнюю поверхность призмы рефрактометра наносят две капли исследуемого сока и прижимают верхней поверхностью призмы. Направляют прибор на свет и вращением винта на тубусе добиваются четкого изображения в окуляре вертикальной шкалы с делениями, обозначающими содержание сахара в растворе, %. Деление шкалы, через которое проходит горизонтальная граница между светлым и темным полями, соответствует концентрации сахара в клеточном соке испытуемого растения.

Для каждого варианта делают не менее трех определений. При переходе от одного варианта к другому призму протирают сначала влажной, а затем сухой фильтровальной бумагой, чтобы смыть предыдущий раствор.

По специальной таблице (см. приложение) находят величину потенциального осмотического давления в килопаскалях, соответствующую найденной концентрации клеточного сока.

Результаты опыта записывают по следующей форме:

Вариант	Концентрация клеточного сока, %	Потенциальное осмотическое давление, кПа

Материалы и оборудование. Листья растений. Ручной пресс или ступка с пестиком, марля, ножницы, фарфоровые чашки, пипетки, рефрактометр, фильтровальная бумага.

**Работа 10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДНОГО ПОТЕНЦИАЛА
РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ
МЕТОДОМ ПОЛОСОК ПО ЛИЛИЕНШТЕРН**

Вводные пояснения. Водный потенциал характеризует сосущую силу растительной ткани. Его определяют для того, чтобы вовремя уловить признаки обезвоживания растений и правильно выбрать время полива.

Метод полосок основан на подборе наружного раствора такой концентрации, при погружении в который длина полоски растительной ткани не меняется. Если осмотический потенциал наружного раствора превышает водный потенциал ткани, то раствор отнимает воду от клеток, в результате их объем и длина полоски уменьшаются. Если осмотический потенциал раствора меньше водного потенциала ткани, то клетки, всасывая воду из раствора, увеличиваются в объеме и длина полоски возрастает. В растворе, где осмотический потенциал равен водному потенциалу ткани, длина полоски не изменяется.

Порядок работы. В пробирках готовят по 10 мл 0,6 М; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 М растворов сахарозы. Из клубня картофеля вырезают двенадцать полосок длиной 4...6 см и сечением около 4 мм². Концы полосок срезают наискось. Работать следует быстро, чтобы исключить подсыхание полосок. Миллиметровой линейкой точно измеряют их длину и помещают по две в каждую пробирку. Через 20 мин полоски вынимают, обсушивают фильтровальной бумагой и снова измеряют длину.

Для расчета величины водного потенциала берут концентрацию, при которой длина полосок не изменялась. Величину водного потенциала рассчитывают по формуле (обозначения те же, что и в работе 8):

$$\psi_{\text{в}} = -\Pi = -RTci.$$

Результаты опыта записывают по форме (табл. 7).

7. Определение водного потенциала

Концентрация раствора сахарозы, мг/л	На 10 мл раствора		Длина полоски ткани, мм		Концентрация раствора, при которой длина полосок не изменялась, мг/л	Водный потенциал, кПа
	1 М сахарозы, мл	воды, мл	перед погружением в раствор	после пребывания в растворе		
0,6	6	4				
0,5	5	5				
0,4	4	6				
0,3	3	7				
0,2	2	8				
0,1	1	9				

Материалы и оборудование. Клубни картофеля, 1 М раствор сахарозы.

Штативы с шестью пробирками, градуированные пипетки на 10 мл, пинцеты, ланцеты, ножи, часы, миллиметровые линейки.

Работа 11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДНОГО ПОТЕНЦИАЛА ЛИСТЬЕВ МЕТОДОМ ШАРДАКОВА

Вводные пояснения. Метод основан на подборе раствора, концентрация которого не изменяется при погружении в него растительной ткани. В этом случае величина осмотического потенциала раствора равна водному потенциалу клеток листа.

Порядок работы. Пробирки расставляют в штативе в два ряда: пять вверх и пять вниз. В верхних готовят по 10 мл 0,5 М; 0,4; 0,3; 0,2 и 0,1 М растворов сахарозы путем разбавления 1 М раствора сахарозы дистиллированной водой. В пробирки нижнего ряда переносят по 0,5 мл раствора из верхних и все пробирки закрывают пробками.

Из листа сверлом вырезают десять дисков, для чего лист поворачивают нижней стороной вверх, подкладывают под него резиновую пластинку. Диски выбивают между крупными жилками. В каждую пробирку нижнего ряда опускают по два диска на 40 мин. Каждые 10 мин пробирки с дисками встряхивают. Затем стеклянной палочкой удаляют диски и подкрашивают опытные растворы в пробирках нижнего ряда метиленовой синей, взятой в небольшом количестве (на кончике про-

волоки). Содержимое встряхивают, добиваясь равномерной окраски раствора.

Пипеткой на 0,5 мл набирают подкрашенный опытный раствор. Конец пипетки опускают в соответствующий исходный раствор в пробирке верхнего ряда так, чтобы уровень жидкости в пипетке превышал уровень раствора в пробирке. Медленно выпускают жидкость из пипетки в исходный раствор, отмечая направление движения струйки. Если концентрация и, следовательно, плотность окрашенного раствора увеличились по сравнению с исходными, то струйка пойдет вниз, если концентрация уменьшилась — струйка пойдет вверх. При равенстве концентраций струйка равномерно распределяется внутри пробирки с исходным раствором.

Величину водного потенциала по найденной опытным путем неизменившейся концентрации рассчитывают по формуле (см. работу 10).

Результаты опыта записывают по форме (табл. 8).

8. Определение водного потенциала методом Шардакова

Концентрация раствора сахарозы, моль/л	На 10 мл раствора		Направление движения струйки	Концентрация внешнего раствора, оставшегося неизмененным, моль/л	Водный потенциал, кПа
	1 М раствора сахарозы, мл	воды, мл			
0,5	5	5			
0,4	4	6			
0,3	3	7			
0,2	2	8			
0,1	1	9			

Материалы и оборудование. Растения с листьями, 1 М раствор сахарозы, метиленовая синяя.

Штативы с двумя рядами пробирок, градуированные пипетки на 10 мл, мерные пипетки на 0,5 мл, сверла диаметром 0,9 см, резиновые пластинки, линнеты, проволоки, пробки для пробирок, стеклянные палочки.

Работа 12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДНОГО ПОТЕНЦИАЛА РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ ПО МАКСИМОВУ И ПЕТИНОВУ

Вводные пояснения. Принцип метода тот же, что и в работе 11.

Порядок работы. В штативе расставляют десять пробирок: пять вверху и пять внизу. Из 1 М раствора са-

харозы в верхних пробирках готовят по 10 мл 0,1 М; 0,2; 0,3; 0,4 и 0,5 М растворов сахарозы. В соответствующие нижние пробирки переносят из верхних по 2 мл жидкости и в каждую из них при помощи стеклянной палочки помещают по восемь или десять дисков, выбитых сверлом из листовой пластинки (без жилок). Пробирки закрывают пробками. Кусочки листовой пластинки оставляют в растворах на 40...60 мин, периодически встряхивая пробирки. Затем вынимают диски, а пробирки закрывают пробками.

Для определения концентрации раствора сахарозы после пребывания в нем испытуемого материала можно пользоваться рефрактометрами марок 06-101А или РПЛ.

На призму рефрактометра стеклянной палочкой наносят по две капли сначала исходного, а потом соответствующего опытного растворов. Палочку и призму перед каждым новым определением протирают фильтровальной бумагой. Находят раствор, концентрация которого не изменилась после пребывания в нем опытных объектов. Если водный потенциал клеток листа больше осмотического потенциала одного раствора, но меньше другого, для расчета берут среднюю концентрацию этих двух растворов. Величину водного потенциала Ψ_w рассчитывают по формуле (см. работу 10).

Результаты опыта записывают по следующей форме:

Объект	№ проби- рки	Показания рефракто- метра, % сахара		Концентрация, оставшаяся неизменной, моль/л	Водный по- тен- циал, кПа
		до опыта	после опыта		

Материалы и оборудование. Листья растений, 1 М раствор сахарозы.

Сверла диаметром 0,6...0,8 см, резиновые пробки для выбивания дисков из листьев, стеклянные палочки, пробирки, штативы для пробирок, градуированные пипетки на 10 мл, рефрактометры, фильтровальная бумага.

Глава 2

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЯ

Электрофизиология — наука, занимающаяся исследованием электрической активности биологических объектов

в состоянии покоя и возбуждения, а также их пассивных электрических свойств (сопротивления, емкости) при пропускании электрического тока.

Электрофизиологические методы исследования дают возможность получить информацию об электрической полярности, проводимости и функциональном состоянии ткани, органа, клетки и ее органелл без существенного травмирования объекта. Данные методы строго количественные и при использовании современных электронных приборов позволяют делать автоматическую запись и компьютерную обработку результатов опыта.

Методы, применяемые в электрофизиологии, незаменимы при исследовании процесса возбуждения, так как в основе этого свойства живых систем лежат изменения электрической полярности мембран. В свою очередь, функционирование мембран связано с их электрической полярностью. Регистрация мембранной разности потенциалов дает важную информацию при исследовании транспорта ионов, межклеточных взаимодействий, природы регуляторной системы растений. В медицине информацию о работе сердца, мозга или мышцы получают, следя за электрическими сигналами, сопровождающими их активность.

Обширный фактический материал, накопленный электрофизиологами, свидетельствует о единстве электрических свойств живых систем. Сокращение и расслабление мышц, ловчие движения росянки, изменение функциональной активности мозга или корня растения — все эти процессы сопряжены с кратковременными или длительными электрическими перестройками мембран, изменением электрической полярности органелл, клеток и даже органов и тканей. Задача электрофизиологии растений состоит не только в раскрытии природы и роли электрогенеза, но и в практическом использовании этих знаний для диагностики функционального состояния и управления физиологическими процессами растений.

Биоэлектрические потенциалы растений; основные термины электрофизиологии. Биоэлектрические потенциалы растений — это разность электрических потенциалов между внешней и внутренней поверхностями мембран клеток и их органелл, а также между органеллами, клетками, тканями и органами растений, различающимися по функциональной или метаболической активности. Мембранная разность электрических потенциа-

лов включает градиенты электрических зарядов, обусловленные полярностью фиксированных зарядов (донановский потенциал); асимметрией распределения ионов, главным образом K^+ (диффузионный потенциал), а также работой электрогенных насосов.

Наиболее поляризована плазмалемма (100...200 мВ), менее — тонопласт (0...30 мВ) и клеточная оболочка (10...15 мВ). Цитоплазма клетки заряжена отрицательно относительно внешнего раствора и вакуоли. Разность потенциалов по обе стороны мембраны толщиной всего 5...10 нм создает электрическое поле напряженностью порядка 100 000 В/см, играющее важную роль в процессах трансформации энергии поглощения, транспорта и распределения органических и неорганических ионов.

Различают *биоэлектрические потенциалы (биопотенциалы) покоя и потенциалы действия*. Биопотенциалы покоя — это уровень разности потенциалов, например, между внутриклеточной и внешней средой, между зонами корня в стационарных условиях. При действии раздражителей (изменение ионного состава раствора, температуры, освещенности, механическое давление, действие физиологически активных веществ, электрического тока и пр.) этот уровень может изменяться. Уменьшение разности потенциалов называют *деполяризацией*, а увеличение — *гиперполяризацией*.

При значительном снижении внутриклеточной разности потенциалов до определенного порогового уровня наблюдается резкое изменение проницаемости мембран и обращение (реверсия) ионных потоков. Ионы кальция из наружной среды, окружающей клетку, поступают в нее, а ионы хлора и ионы калия выходят из клетки в омывающий раствор.

При возбуждении возможно кратковременное изменение электрической полярности плазмалеммы — наружная ее поверхность становится отрицательно заряженной по отношению к внутренней. Наиболее общая форма реакции живых систем — локальное возбуждение, ограниченное местом нанесения раздражения и называемое *местным возбуждением*. В случае достаточно сильного раздражения — *порогового* и *сверхпорогового* — возбуждение распространяется вдоль клетки или ряда клеток, способных проводить возбуждение.

Распространяющееся возбуждение, или ток действия, регистрируется в виде двухфазного изменения разности потенциалов.

При исследовании ответных биоэлектрических реакций учитывают: время от момента воздействия раздражителя на объект до появления ответной реакции — *латентный период*; максимальное отклонение разности потенциалов в процессе возбуждения — *амплитуду биоэлектрической реакции*; *время нарастания* и *время спада потенциала действия*; *скорость распространения волны возбуждения* (потенциала действия), определяемую при помощи двух электродов по времени прохождения волной межэлектродного пространства, а также *рефрактерный период* — время, в течение которого клетка или ткань полностью или частично невозбудима после предшествующего возбуждения. Скорость распространения потенциала действия в нервных клетках животных в тысячи раз больше, чем в растительных. Однако у некоторых представителей животного мира, например виноградной улитки, скорость распространения электрического возбуждения такая же, как и у растений (0,2...0,5 см/с). Биопотенциалы покоя и амплитуда потенциалов действия растительных клеток, как правило, выше, чем животных.

При регистрации потенциалов действия у одной клетки его скорость и амплитуда остаются неизменными. Процесс распространения возбуждения у высших растений охватывает тысячи специализированных клеток, примыкающих к сосудам ксилемы и флоэмы, и при передаче на большие расстояния волна возбуждения может угасать, иметь разную скорость в базипетальном и акропетальном направлениях. У высших растений на скорость и амплитуду волны возбуждения влияют водно-ионные потоки, движущиеся по ксилеме.

Любые физические и химические воздействия достаточной силы на клетку изменяют структурные, функциональные и электрические свойства клеточных мембран, вызывая биоэлектрическую реакцию и перераспределение ионов. По параметрам биоэлектрических реакций можно судить о физиологическом состоянии, реактивности растения и его органов, о природе и силе воздействия. Ответные биоэлектрические реакции зависят также от вида, сорта и возраста растения. Потенциалы (токи) действия у растений, как и у животных,

осуществляют быструю прямую и обратную связь между клетками, тканями и органами.

Приборы и электроды для исследования биопотенциалов растений. Мембраны растительных клеток имеют высокое сопротивление — порядка $50\,000\text{ Ом}\cdot\text{см}^2$. Поэтому при регистрации биоэлектрических потенциалов используют высокоомные милливольтметры постоянного тока, например лабораторные рН-метры.

Для отведения биопотенциалов растений применяют лабораторные неполяризующиеся электроды, как правило, хлорсеребряные (ЭВЛ-1МЗ и др.), чтобы на измеряемую разность потенциалов не влияла э. д. с. поляризации электродов. Внутриклеточные биопотенциалы регистрируют при помощи микроэлектродов, поверхностные — через влажные марлевые, ватные и другие фитили. Для изучения динамики или быстрых изменений разности потенциалов, т. е. биоэлектрических реакций растений, используют самопишущие милливольтметры постоянного тока или компьютеры.

Электрическая проводимость тканей растений как показатель их функционального состояния. Электрическая проводимость тканей растений определяется взаимодействием наложенного электрического поля со свободными и связанными зарядами объекта. Она зависит как от свойств электрического поля (постоянный или переменный ток), так и от свойств объекта. Электрическая проводимость, измеряемая при пропускании постоянного тока, определяется в основном свободными зарядами. Во время пропускания переменного тока существенное значение имеют связанные заряды. Общая электрическая проводимость зависит от частоты переменного тока.

Постоянный электрический ток, проходя через ткани растения, разветвляется, как по системе проводников, с разным сопротивлением. Наименьшее сопротивление (величина, обратная электрической проводимости) имеют оводненные клеточные стенки, хорошо проводящие электрический ток. Гораздо большее сопротивление оказывают мембраны, липидные слои которых служат хорошими изоляторами. Сопротивление плазмодесм, обеспечивающих межклеточные контакты, в десятки раз меньше мембранного, но также достаточно велико.

Для переменного тока, особенно высоких частот, липидные слои мембран не служат существенным барье-

ром, поэтому сопротивление биологических объектов, измеренное при пропускании переменного тока, меньше, чем при пропускании постоянного,

Приборы и электроды для измерения электрической проводимости. Измерительная аппаратура при исследовании электрической проводимости цитоплазматических мембран или ткани растения должна быть высокочувствительной, т. е. регистрировать изменения электрического тока силой порядка $10^{-10} \dots 10^{-9}$ А при выполнении опытов на одиночных клетках. Суммарная сила электрического тока, проходящего через ткань, включающую тысячи параллельно и последовательно соединенных клеток, не должна быть больше $10^{-6} \dots 10^{-5}$ А. Использование для измерения электрической проводимости растительных тканей тока силой $10^{-3} \dots 10^{-4}$ А вызывает тепловое повреждение, нарушение естественной поляризации мембран, т. е. «пробой».

Электроды можно приложить к ткани (обычно через увлажненные прокладки) или ввести в нее. Для измерения электрической проводимости клеточных мембран используют стеклянные микроэлектроды, заполненные 2,5 М раствором КСl и электролитически связанные с неполяризующимися (хлорсеребряными) электродами.

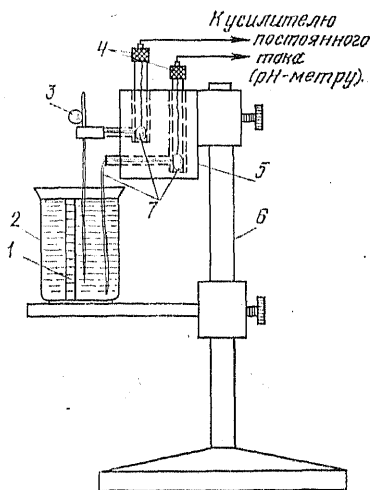
Для измерения электрической проводимости тканей растений служат металлические или графитовые электроды, вкалываемые в ткань. Чтобы избежать поляризации электродов, измерения выполняют при переменном токе частотой порядка $10^3 \dots 10^4$ Гц. Б. Н. Тарусовым предложен способ определения жизнеспособности биологических объектов по коэффициенту поляризации — отношению сопротивлений, измеренных при пропускании токов высоких (10^6 Гц) и низких частот (10^3 Гц).

Работа 13. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРАДИЕНТОВ БИОПОТЕНЦИАЛОВ МЕЖДУ ЗОНАМИ КОРНЯ И ИХ ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ИОННОГО СОСТАВА СРЕДЫ

Вводные пояснения. Корень подразделяют на три основные зоны (деления, растяжения и корневых волосков), различающиеся по анатомическим, биохимическим и функциональным особенностям. Клетки меристемной зоны отличаются высокой физиологической активностью

Рис. 1. Установка для измерения разности потенциалов между зонами корня:

1 — миллиметровая линейка; 2 — раствор 1 мМ KCl+0,5 мМ CaCl₂; 3 — пятидневный проросток кукурузы; 4 — неполяризуемые хлор-серебряные электроды типа ЭВЛ-3М; 5 — держатель из плексигласа для электродов; 6 — штатив; 7 — ватные фитили



(у кукурузы 0...2 мм от кончика корня). В них нет большой центральной вакуоли, и весь объем заполнен цитоплазмой с включенными в нее мелкими вакуолями. В зоне растяжения и корневых волосков вакуоль вполне сформирована. Активное поглощение ионов, их пассивные потоки неодинаковы по зонам корня. Характер поглощения калия (основной потенциалопределяющий ион) зависит от его концентрации во внешнем растворе. Так, у корня пятидневных проростков кукурузы клетки зоны растяжения и корневых волосков поглощают калий активно из 10^{-4} М раствора и пассивно из 10^{-3} М.

Цель работы — продемонстрировать значительные градиенты биопотенциалов вдоль корня, показать зависимость этих градиентов от ионного состава среды.

Порядок работы. Определение градиентов биопотенциалов. Измеряют величину и знак разности потенциалов (РП) между неполяризуемыми электродами в растворе 1 мМ KCl+0,5 мМ CaCl₂. Подбирают пару электродов, разность потенциалов между которыми не превышает 10 мВ.

Корень пятидневного проростка кукурузы укрепляют в резиновом зажиме хлорсеребряного электрода на расстоянии 1 см от зерновки (рис. 1). Второй электрод опускают в раствор: 1 мМ KCl+0,5 мМ CaCl₂. Корень проростка аккуратно погружают в раствор на глубину 1 мм. Со шкалы милливольтметра снимают показания, вычитая (с учетом знака) исходную РП между электродами. Далее регистрируют разность потенциа-

9. Зависимость разности потенциалов между зонами корня от глубины его погружения

Наименование	Глубина погружения корня, мм							
	1	3	5	7	10	15	30	25

Разность потенциалов,
мВ:

между погруженной в
раствор частью корня
и его основанием
между зонами корня

лов при ступенчатом погружении корня — вначале каждые 2 мм, затем каждые 5 мм. Результаты записывают по форме (табл. 9).

Установление зависимости градиентов биопотенциалов от ионного состава среды. Корень пятидневного проростка кукурузы закрепляют в зажиме электрода на расстоянии 1 см от зерновки. Другой электрод опускают в испытуемый раствор. При последовательном (ступенчатом) погружении корня регистрируют знак и величину разности потенциалов в растворах KCl и $CaCl_2$ следующих концентраций: 0,1; 1,0; 10,0 мМ и в буферных растворах KCl с рН: 5,0; 7,0; 9,0.

По данным опытов строят график: по оси ординат откладывают величины разности потенциалов для каждой из трех зон корня (в милливольтх), по оси абсцисс — концентрации испытуемых катионов. Отмечают зависимость разности потенциалов от концентрации калия и рН растворов.

Материалы и оборудование. Пятидневные проростки кукурузы, раствор 1 мМ $KCl + 0,5$ мМ $CaCl_2$; 0,1; 1,0; 10,0 мМ растворы KCl и $CaCl_2$; 0,1 М; 1,0; 10,0; 100,0 мМ растворы $CaCl_2$; буферные растворы с рН: 5,0; 7,0; 9,0.

Стаканы на 100 мл высотой 8...10 см, хлорсеребряные электроды, штативы с держателем для электродов, милливольтметр постоянного тока (рН-метр).

Работа 14. УСТАНОВЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ БИОПЕНЦИАЛОВ КЛЕТОК КОРНЯ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

Вводные пояснения. Одна из составляющих разности биоэлектрических потенциалов обусловлена работой

мембранных электрогенных насосов и поэтому связана с основным энергетическим процессом — дыханием. Дыхание при низкой температуре может быть «выключено». Это сопровождается деполяризацией клетки.

Цель работы — выявить зависимость мембранной разности потенциалов эпидермальных клеток корня от температуры и определить температурный коэффициент этой зависимости.

Порядок работы. Определение зависимости мембранных потенциалов клеток эпидермиса корня от температуры. Корень четырехшестидневного проростка тыквы длиной 5...6 см фиксируют в щелевидной камере глубиной 3 мм и шириной 1,5 мм, вырезанной в пластине изplexигласа толщиной 4 мм (рис. 2). Через камеру пропускают раствор (1 мМ KCl+0,5 мМ CaCl₂). В боковой стенке камеры есть отверстие диаметром 1 мм, через которое вводят микроэлектрод.

Для охлаждения раствора и корня камеру закрепляют на термостоліке микрохолодильника ТОС-11, включенного в электрическую сеть через автотрансформатор

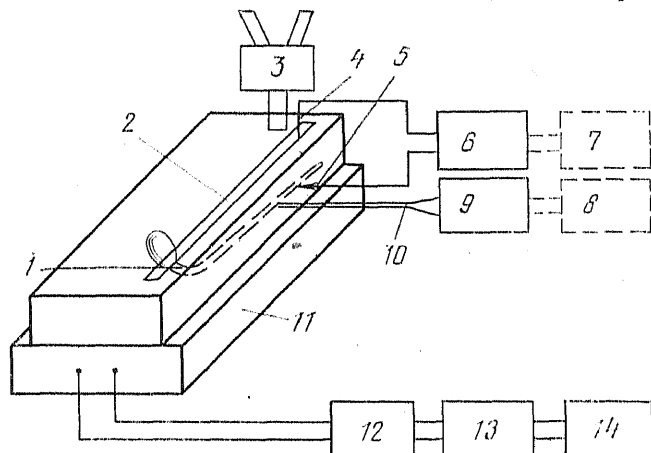


Рис. 2. Блок-схема установки для изучения температурной зависимости разности потенциалов клеток корня:

1 — проросток тыквы; 2 — щелевидная камера; 3 — микроскоп МБС-1; 4 — электрод сравнения; 5 — микроэлектрод; 6 — милливольтметр постоянного тока (рН-метр); 7 — самонесущий милливольтметр постоянного тока; 8 — самонесущий; 9 — прибор, регистрирующий температуру раствора; 10 — микро-термистор конструкции В. Г. Карманова; 11 — охлаждающий элемент ТОС-11; 12 — питающее устройство ТОС-11; 13 — автотрансформатор ЛАТР-2; 14 — стабилизатор напряжения

матор ЛАТР-2. Регулируя напряжение тока питания охлаждающего столика, можно плавно менять режим охлаждения. Температуру раствора в камере регистрируют при помощи микротермистора МТ-54 конструкции В. Г. Карманова.

Микроэлектроды изготавливают из специального стекла пирекс на полуавтоматической установке МЭ-3 или МЭ-4 и заполняют 2,5 ММ раствором КСl (диаметр кончика микроэлектрода 0,5...1 мкм). Для тонкой подачи микроэлектрода (точность до 0,5 мкм) используют микроманипулятор ММ-1 или верньерное устройство от микроскопа, на подвижной части которого крепят хлорсеребряный электрод ЭВЛ-1МЗ с микроэлектродом.

Электрод сравнения, выполненный аналогично на основе промышленного хлорсеребряного электрода, погружают в раствор, омывающий корень. Микроэлектрод вводят под микроскопом МБС-1 при увеличении $\times 80... \times 140$.

Прежде чем ввести микроэлектрод в клетку, регистрируют межэлектродную разность потенциалов в растворе, омывающем корень при 22°C. Далее под микроскопом при помощи микроманипулятора электрод вводят в эпидермальную клетку зоны растяжения — начала образования корневых волосков, т. е. в 6...8 мм от кончика корня. При удачном введении микроэлектрода регистрируется устойчивая разность потенциалов (с учетом межэлектродной РП) порядка 150...175 мВ. Падение РП после введения электрода возможно вследствие травмирования клетки или введения электрода в межклеточное пространство. При стабильном значении мембранной разности потенциалов начинают охлаждать камеру, увеличивая напряжение питания термостоллика при помощи автотрансформатора таким образом, чтобы скорость изменения температуры составляла примерно 0,5°C в минуту. При 12 и 2°C регистрируют РП в течение 10...15 мин. Плавно восстанавливая исходный температурный режим, наблюдают восстановление РП. При снижении температуры с 22 до 12°C температурный коэффициент составляет 1,2...1,3, в диапазоне 12...2°C он увеличивается до 2...2,5.

Определение температурного коэффициента. Корень пяти-шестидневного проростка тыквы аккуратно закрепляют в зажиме электрода на рас-

стоянии 1 см от семени. Второй электрод опускают в раствор 1,0 мМ KCl + 0,5 мМ CaCl₂ при 22 °С, в котором находится апикальная часть корня длиной 5 мм. С учетом межэлектродной разности потенциалов регистрируют РП между основанием и апикальной частью корня в этом растворе, а затем в растворах того же состава, но при различной температуре. Продолжительность измерения разности потенциалов в каждом опыте 10 мин.

Результаты записывают по форме (табл. 10).

10. Схема записи результатов

Наименование	Температура раствора, °С						
	12	2	12	22	32	42	52

Разность потенциалов, мВ
Температурный коэффициент (Q_{10})

Материалы и оборудование. Пятидневные проростки тыквы с неискривленными корнями длиной 5...6 см, раствор для объекта 1 мМ KCl + 0,5 мМ CaCl₂, 2,5 мМ раствор KCl для заполнения микроэлектродов.

Камеры из плексигласа, охлаждающий термостоллик ТОС-II, автотрансформатор ЛАТР-2, измеритель температуры с микротермистором МТ-54 конструкции В. Г. Карманова, трубочки диаметром 1,2...1,8 мм из стекла С-38-1 (пирекс) для микроэлектродов, полуавтомат для изготовления микроэлектродов МЭ-3 или МЭ-4, устройство для микроподачи электрода (микроманипулятор ММ-1 или верньерное устройство микроскопа), лабораторный хлорсеребряный электрод ЭВЛ-3М с цанговым зажимом для микроэлектрода, высокоомный милливольтметр постоянного тока (рН-метр), микроскоп МБС-1, штативы с держателями для микроэлектродов.

Работа 15. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗНОСТИ БИОПЕНЦИАЛОВ МЕЖДУ ПОВРЕЖДЕННЫМИ И НЕПОВРЕЖДЕННЫМИ УЧАСТКАМИ ТКАНИ РАСТЕНИЯ

Вводные пояснения. В общей электрофизиологии выделяют демаркационный биопотенциал, или потенциал повреждения. Это градиент потенциалов, регистрируемый между поврежденным и нативным участками листа, корня (повреждение может быть вызвано перерезанием, ожогом, промораживанием и пр.). Область по-

вреждения ткани или клетки всегда электроотрицательна. В норме между однородными участками стебля, корня, черешка листа разность потенциалов невелика. Нарушение целостности клеточных структур создает условия для контакта с внутриклеточным содержимым (со временем поврежденный участок изолируется мембранными структурами). Демаркационный потенциал нестабилен, что связано с процессами возбуждения и репарации тканей.

Цель работы — продемонстрировать возникновение отрицательного биопотенциала в области повреждения ткани.

Порядок работы. Корень пятидневного проростка кукурузы закрепляют в зажиме электрода на расстоянии 1 см от зерновки. Другой электрод опускают в раствор 1 мМ KCl + 0,5 мМ CaCl₂, в который погружают корень на глубину 1 мм. Регистрируют разность потенциалов между меристемной зоной корня и его основанием. Сделав срез корня (в растворе) на расстоянии 1 мм от его кончика, сразу же измеряют демаркационный потенциал зоны деления клеток. Разность потенциалов регистрируют с одномоментным интервалом в течение 15 мин. Аналогично регистрируют биопотенциал повреждения корня в зоне растяжения и корневых волосков, перерезая корень в 5 и 15 мм от кончика корня соответственно. В каждом опыте используют свежий проросток.

Материалы и оборудование. Пятидневные проростки кукурузы, раствор 1 мМ KCl + 0,5 мМ CaCl₂.

Два неполяризующихся хлорсеребряных электрода типа ЭВЛ-3М, милливольтметр постоянного тока (рН-метр), штативы с держателем электродов.

Работа 16. НАБЛЮДЕНИЕ СВЕТОИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ РАЗНОСТИ ПОТЕНЦИАЛОВ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТОК

Вводные пояснения. Светоиндуцированные изменения мембранной разности потенциалов обычно определяются чередующимися волнами деполяризации и гиперполяризации. Однако у ряда растений (элодея, валлиснерия и др.) наблюдается четкая гиперполяризация при освещении листа после темноты, достигающая 80 мВ. Это свидетельствует о энергозависимости мембранной разности потенциалов, возрастающей при увеличении

внутриклеточного содержания АТФ за счет фотосинтетического фосфорилирования.

Цель работы — продемонстрировать влияние света как раздражающего и энергетического фактора на мембранную разность биопотенциалов.

Порядок работы. Отчлененный за 2 ч до опыта лист элодеи фиксируют в щелевидной камере из плексигласа (см. работу 14). С раствором контактирует хлорсеребряный электрод сравнения. При наблюдении под микроскопом МБС-1 в камеру вводят микроэлектрод и регистрируют межэлектродную РП в растворе.

Затем аккуратно вводят микроэлектрод в клетку листа. При стабильном значении РП порядка 180...250 мВ (за вычетом исходной межэлектродной РП) камеру с листом затевают и через 15...20 мин лист освещают (освещенность порядка 100 лк). Сравнивают величины РП в темноте и на свету.

Градиенты биоэлектрических потенциалов между одинаково освещенными участками листа незначительны и заметно возрастают, если создать контрастные условия освещенности между ними. Освещенный участок листа по отношению к затемненному становится негативированным. Это свидетельствует о действии света как раздражителя.

Один электрод подводят к основанию, а второй (электрод сравнения) — к кончику листа двухнедельного растения фасоли. До начала опыта растения 15 мин выдерживают в темноте, изменения РП регистрируют милливольтметром постоянного тока (рН-метром) сразу же после включения света (освещенность 10 000...12 000 лк).

Материалы и оборудование. Листья элодеи, двухнедельные растения фасоли, раствор для объекта 1 мМ КСl + 0,5 мМ СаСl₂.

Камеры из плексигласа, микроэлектроды из стекла С-38-1 с кончиками диаметром 0,5 мкм, устройство для микроподачи электрода, два лабораторных неполяризуемых хлорсеребряных электрода ЭВЛ-1МЗ с цапговым зажимом для микроэлектродов, высокоомный милливольтметр постоянного тока (рН-метр), микроскоп МБС-1, штативы с держателем для микроэлектродов.

Работа 17. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОПЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ У ОТРЕЗКОВ СТЕБЛЯ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Вводные пояснения. Действие слабых раздражителей на стебель растений не дает возможности наблюдать воз-

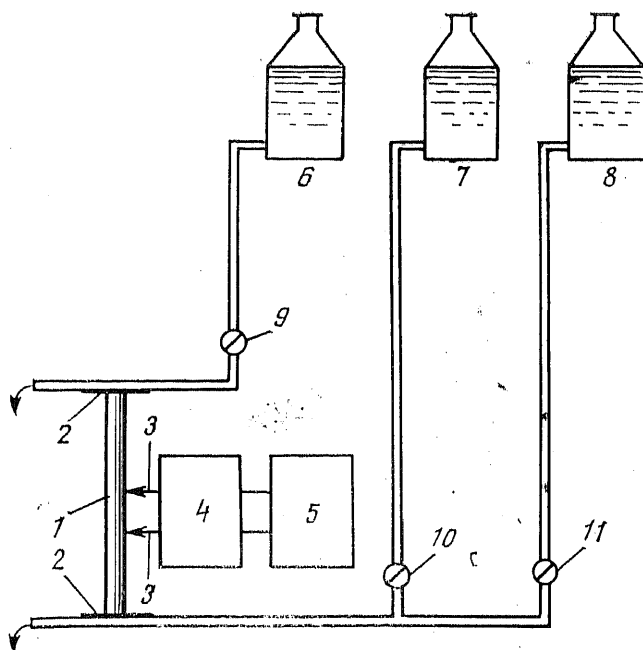


Рис. 3. Блок-схема установки для регистрации потенциалов действия у отрезков стебля подсолнечника:

1 — гипокотиль четырнадцатидневного растения подсолнечника; 2 — резиновая эластичная мембрана; 3 — отводящие хлорсеребряные электроды; 4 — милливольтметр постоянного тока; 5 — самописец; 6, 7 — дистиллированная вода; 8 — раствор 0,1 М KCl; 9, 10, 11 — распределительные краны

никновение биопотенциалов действия, так как проводящие возбуждение клетки проводящих пучков защищены от внешних раздражителей. Используя в качестве объекта отрезок стебля, в котором обнажены возбудимые клетки (считается, что ими служат удлинённые клетки паренхимы, примыкающие к сосудам ксилемы и членикам ситовидных трубок флоэмы), сравнительно просто убедиться в способности растений генерировать и проводить биопотенциалы действия.

Цель работы — продемонстрировать на отрезке гипокотыля подсолнечника биопотенциал действия.

Порядок работы. Отрезок стебля подсолнечника фиксируют вертикально в зажимах двух отводящих электродов на расстоянии 2 см один от другого (рис. 3). Нижнюю часть отрезка погружают в дистиллированную воду на глубину 1 см.

В течение 15...20 мин записывают биопотенциал покоя и, если он стабилен, заменяют дистиллированную воду 0,1 М раствором KCl, вызывающим возбуждение чувствительных клеток стебля и биопотенциал действия, регистрируемый в виде двухфазной кривой.

Определяют основные параметры тока действия: амплитуду, время подъема и спада биопотенциала, общую продолжительность реакции. Крутизну изменения биопотенциала вычисляют при делении значения амплитуды потенциала действия на значения времени его нарастания.

Материалы и оборудование. Отрезки стебля двухнедельного растения подсолнечника, приготовленные за несколько часов до опыта, 0,1 М раствор KCl, дистиллированная вода.

Проточная установка с распределительными кранами и эластичными мембранами для фиксирования отрезков стебля подсолнечника, два хлорсеребряных отводящих электрода ЭВЛ-3М с насадками, штативы для электродов, высокоомный милливольтметр постоянного тока (рН-метр), самопишущий милливольтметр типа КСП-4.

Работа 18. НАБЛЮДЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ РАСТЕНИЙ

Вводные пояснения. Используя для опытов растения фасоли, подсолнечника и тыквы, можно убедиться, что каждое из них имеет свои параметры ответных реакций. Особый интерес представляют различия в биоэлектрических реакциях растений одного вида, но разной степени устойчивости, например, к низким и высоким температурам.

Порядок работы. Стебель двухнедельного растения фасоли закрепляют в зажимах отводящих электродов так, чтобы корни находились в дистиллированной воде. Через 10...15 мин после подведения электродов включают самопишущий милливольтметр и записывают стационарный уровень разности потенциалов. При стабильной записи раздражают корень, погружая его на 1 мин в 0,5 М раствор KCl. На ленте отмечают начало воздействия и его окончание. После возвращения разности потенциалов к исходному уровню опыт заканчивают. Снимают основные показатели ответной реакции: амплитуду, время нарастания, время спада и общую продолжительность реакции. Аналогичные опыты выполняют с двухнедельными растениями подсолнечника и тыквы.

По описанной схеме записывают биоэлектрические реакции на температурные раздражения корня (60°C в течение 10 с) у семидневных проростков пшеницы сортов Краснодарская 39 (морозостойкая) и Безостая 1 (неморозостойкая) и сортов ячменя Донецкий 4 (жаростойкий) и Московский 121 (нежаростойкий). Сравнивают амплитуды биоэлектрических реакций. Делают вывод о том, что амплитуда ответной реакции проростков пшеницы и ячменя при стандартном раздражении корня у неустойчивых сортов выше, чем у устойчивых. Результаты записывают по форме (табл. 11).

11. Биоэлектрические реакции разных растений

Растение	Амплитуда первой фазы реакции, мВ	Время нарастания потенциала, с	Скорость нарастания потенциала, мВ/с
Фасоль			
Подсолнечник			
Тыква			
Пшеница			
Краснодарская 39			
Безостая 1			
Ячмень			
Донецкий 4			
Московский 121			

Материалы и оборудование. Двухнедельные растения фасоли, подсолнечника и тыквы, семидневные проростки пшеницы сортов Краснодарская 39 и Безостая 1, ячменя сортов Донецкий 4 и Московский 121, 0,5 М раствор KCl, дистиллированная вода, нагретая до 60°C .

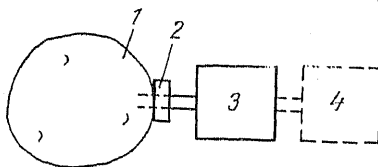
Отводящие электроды, милливольтметр постоянного тока (рН-метр), самопишущий милливольтметр постоянного тока, два стакана на 100 мл с изолированными ручками.

Работа 19. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ПРОВОДИМОСТИ ПОВРЕЖДЕННЫХ И ЗДОРОВЫХ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

Вводные пояснения. Заболевание клубней картофеля фитофторозом вызывает повреждение клеточных структур, и прежде всего цитоплазматических мембран, в результате чего меняется их проницаемость. Внутриклеточные электролиты выделяются в межклеточное пространство. Поэтому при заболевании, а также повреждающих термических, химических или механических

Рис. 4. Блок-схема установки для измерения электропроводности тканей клубня картофеля:

1 — клубень картофеля; 2 — держатель со стальными иглами; 3 — прибор для измерения электрической проводимости на переменном токе; 4 — самопишущий прибор



воздействиях электрическая проводимость тканей клубня картофеля возрастает.

Порядок работы. Электрическая проводимость клубней картофеля, пораженного фитофторозом. В отмытые и просушенные клубни картофеля, пораженные на 10...20 % фитофторозом, на глубину 3 мм вводят два игольчатых электрода, фиксированных в держателе на расстоянии 3 мм один от другого и подключенных к измерительному прибору (рис. 4). Электрическую проводимость здоровых и пораженных тканей клубня измеряют в десятикратной повторности и определяют среднее ее значение для здоровых и больных клубней.

Электрическая проводимость здоровых клубней. Вырезают пять однородных кубиков размером 1×1 см из здорового клубня картофеля. На глубину 3 мм вводят два игольчатых электрода, подсоединенных к прибору. После десяти измерений (по два у каждого кубика) электроды помещают в кипящую воду на 10 с, охлаждают до исходной температуры, после чего выполняют еще десять измерений и составляют результаты.

Материалы и оборудование. Здоровые и пораженные фитофторозом клубни картофеля. Измеритель R. C. L., фиксированные в держателе металлические игольчатые электроды.

Работа 20. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ПРОВОДИМОСТИ ТКАНЕЙ ЛИСТА ПШЕНИЦЫ ОТ У _____ ИЙ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ И ВОДНОГО РЕЖИМА

Вводные пояснения. Обладая системой регуляции, растения способны поддерживать в определенных пределах водно-солевой баланс клеток и тканей. При значительных изменениях условий минерального питания или водного режима гомеостаз растений нарушается. Это

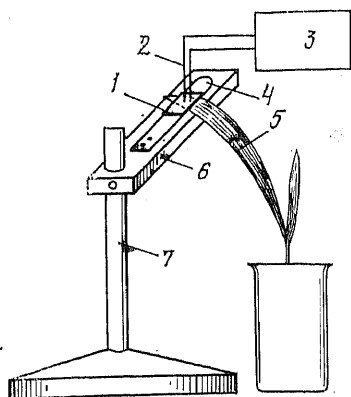


Рис. 5. Установка для измерения электрической проводимости тканей листа:

1 — держатель для игольчатых электродов; 2 — игольчатые электроды; 3 — прибор для измерения электрической проводимости на переменном токе; 4 — стальная пружина, в которую вмонтирован держатель с игольчатыми электродами; 5 — лист пшеницы; 6 — держатель из плексигласа; 7 — штатив

не только отражается на содержании ионов в клетках и тканях, их водоненности, но и вызывает функциональные и конформационные перестройки мембран и плазмодесм, от которых зависят межклеточные контакты и проводимость клеток и тканей.

Порядок работы. Десятидневные растения пшеницы, выращенные в водной культуре на питательной смеси Кнопа в вариантах 0,1; 1 и 4 нормы (по 10 растений в каждом), выдерживают в стационарных условиях в течение 20...30 мин до опыта.

При помощи измерителя R.C.L. регистрируют электрическую проводимость тканей в верхней трети листа (наиболее зависимой от условий питания и водного режима) при помощи двух игольчатых электродов, укрепленных на пружинящей пластине (рис. 5). Прокалывают лист электродами и фиксируют его на изолирующем упоре.

Отмечают более высокие величины электрической проводимости в оптимальных условиях минерального питания.

У тех же растений измеряют электрическую проводимость листьев после подвядания (корни в течение 20...30 мин выдерживают на воздухе).

Делают вывод об уменьшении ее величины в этом случае.

Материалы и оборудование. 30 растений пшеницы, выращенных в водной культуре на 0,1; 1 и 4 нормах смеси Кнопа (десять растений каждого варианта. Измеритель R.C.L., держатель с игольчатыми электродами.

ВОДНЫЙ ОБМЕН

Все физиологические процессы в растении нормально протекают лишь при оптимальном его обеспечении водой. Вода не только растворитель, но и активный структурный компонент клетки. Она участвует в биологических превращениях, например, облегчает взаимодействие между молекулами, служит субстратом для фотосинтеза, участвует в дыхании и многочисленных гидролитических и синтетических процессах.

Вода обладает очень высокой теплоемкостью, поэтому способствует стабилизации температуры растения. Пронизывая все органы, она создает в растении непрерывную фазу, обеспечивая связь органов друг с другом, а также возможность передвижения по растению питательных веществ. Вода играет существенную роль в сохранении формы травянистых растений, поддерживая их клетки в состоянии тургора.

Водный баланс растения определяется соотношением между поглощением и выделением воды. Для сведения водного баланса без дефицита необходимо, чтобы расходование влаги листьями компенсировалось ее поглощением через корни. Подвядание растений приводит к серьезным нарушениям в ультраструктуре клеток и обмену веществ. Даже кратковременный недостаток влаги не проходит для растения бесследно. После установления оптимальных условий водоснабжения фотосинтез восстанавливается лишь через пять-семь дней, рост — через две-три недели, что приводит к значительной потере урожая. Вода поступает в растение в результате корневого давления и присасывающего действия транспирации.

Деятельность нижнего концевой двигателя, состоящая в активном поглощении воды корневой системой, проявляется в плаче и гуттации растений. Силу, поднимающую воду вверх по сосудам, называют *корневым давлением*. Величина его обычно составляет 50... 150 кПа. Корневое давление имеет большое значение в поглощении воды растением при подземном прорастании и в весеннее время до распускания листьев. Существенна роль корневого давления в поддержании непрерывности водных нитей в сосудах ксилемы. Корне-

вое давление ликвидирует в ночные часы возникший за день водный дефицит.

Работа верхнего концевого двигателя обусловлена испарением воды с поверхности листа (транспирацией). Присасывающее действие транспирации передается корням в форме гидродинамического натяжения, связывающего работу обоих двигателей. Работа верхнего концевого двигателя, основанная на использовании в качестве источника энергии солнечной радиации, регулируется автоматически (усиление потери влаги снижает водный потенциал испаряющих клеток, что ведет к усилению поступления в них воды). У хорошо облиственных растений присасывающая сила транспирации во много раз превосходит силу корневого давления.

Основную роль в испарении воды растениями играют устьица. Поэтому интенсивность транспирации в значительной степени зависит от степени их открытости. Кроме того, растение может уменьшать транспирацию, снижая испарение воды с поверхности клеток в межклетники за счет возрастания водоудерживающей способности протоплазмы и клеточных стенок.

При выращивании сельскохозяйственных культур большое значение имеет эффективность использования воды растениями, показателем которой служит транспирационный коэффициент — количество воды, расходуемое растением на создание единицы массы сухого вещества. Для большинства сельскохозяйственных растений транспирационный коэффициент составляет в среднем 300...500.

На величину транспирационного коэффициента влияют условия минерального питания, обеспеченность водой, интенсивность освещения и многие другие факторы. Степень использования воды растением можно повысить, создавая для него оптимальные условия водоснабжения и питания. Закономерности водного обмена растений важно учитывать при разработке агротехнических приемов, направленных на получение высоких урожаев.

Работа 21. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВОДЫ И СУХОГО ВЕЩЕСТВА В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Вводные пояснения. Степень оводненности — важный показатель водного режима растений. С содержанием

воды связаны концентрация клеточного сока, водный потенциал отдельных органов растения, отношение его к почвенной и атмосферной засухе. Определение содержания воды в листьях дает возможность выяснить эколого-физиологические особенности растений, вскрыть механизмы их адаптации к условиям среды.

Содержание влаги в растительных тканях обычно вычисляют в процентах сухой или сырой массы. В листьях большинства растений средней полосы в зависимости от погодных условий и этапов онтогенеза воды содержится 65...82 % сырой массы. Различные по засухоустойчивости растения отличаются характером водного обмена. Растения влаголюбивых видов и сортов содержат много воды при достаточном количестве ее в почве. Однако они быстро теряют воду при понижении влажности почвы. У более устойчивых к засухе форм содержание влаги в растениях, как правило, ниже, но ее количество более устойчиво.

Порядок работы. Количество воды и сухого вещества в листьях определяют весовым методом. Опыт ставят в двух вариантах, для которых используют листья верхнего и нижнего ярусов. Берут только нормально развитые, зеленые, не имеющие явных следов повреждения и подсыхания листья. Каждое определение выполняют в трехкратной повторности при навеске сырых листьев не менее 5 г. Следует точно установить, какие по счету листья относить к нижнему и какие к верхнему ярусам, и соблюдать установленный порядок на всех растениях, идущих в опыт.

Сначала определяют массу абсолютно сухого бюкса. Для этого чисто вымытый бюкс с крышкой, поставленной вертикально, помещают на полку сушильного шкафа при температуре 100...105 °С. Через 1 ч бюкс берут тигельными щипцами и ставят открытым в эксикатор на 30 мин для охлаждения, затем закрывают крышкой и взвешивают на аналитических весах. Еще раз бюкс ставят в сушильный шкаф на 20...30 мин, охлаждают в эксикаторе и снова взвешивают. Если масса бюкса не изменится, то в него можно помещать пробу.

Бюкс с растительным материалом взвешивают на аналитических весах, ставят на 5 ч в шкаф, нагретый до 105 °С, затем охлаждают в эксикаторе (бюкс должен быть открыт) и вновь взвешивают. Однако 5 ч для удаления всей влаги из растения бывает недостаточно,

поэтому бюксы после взвешивания открывают и помещают в сушильный шкаф при той же температуре. Потом охлажденные в эксикаторе бюксы снова взвешивают. Так повторяют до тех пор, пока масса бюкса с материалом не будет постоянной или последующая масса не станет несколько больше предыдущей.

При работе необходимо соблюдать следующие правила. Сырой материал должен лежать в бюксе рыхло. Нельзя держать его в шкафу без перерыва дольше 5 ч. Бюкс с навеской нужно ставить в шкаф, нагретый до 105°C. Температура в различных частях шкафа непостоянна, поэтому бюксы желательно помещать на одном уровне с шариком термометра. Не следует подвигать бюксы близко к стенкам шкафа, так как здесь температура может быть более высокой, чем показывает термометр. Брать бюксы надо щипцами, на концы которых надеты каучуковые кольца, так как из-за прикосновения к бюксам пальцами может измениться масса.

12. Определение содержания воды в листьях

Культура	Ярус листьев	Повторность	Номер бюкса	Масса бюкса, г	Масса бюкса с сырым материалом, г	Масса бюкса с сухим материалом, г	Сырая масса, г	Сухая масса, г	Содержание воды		
									в граммах	в процентах сырой массы	в процентах сухой массы
	Нижний	1									
		2									
		3									
	Верхний	Среднее									
		1									
		2									
		3									
		Среднее									

Вычитая из массы исходного растительного материала массу высушенного материала, получают массу воды во взятой навеске. Рассчитывают содержание воды в процентах сырой и сухой массы материала, делают вывод о зависимости содержания воды в листьях от расположения их на растении.

Результаты опыта записывают по форме (табл. 12).

Материалы и оборудование. Пятнадцатидневные растения подсолнечника или кукурузы. Аналитические весы, сушильный шкаф, боксы, эксикатор, щипцы.

Работа 22. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СКОРОСТЬ И ДВИЖУЩУЮ СИЛУ ВЫДЕЛЕНИЯ ПАСОКИ

Вводные пояснения. В поддержании и регулировании водообмена растений существенная роль принадлежит нагнетательной деятельности корневой системы, одно из проявлений которой — плач, т. е. выделение пасоки срезанным растением.

Д. А. Сабинин предложил компенсационный метод определения корневого давления, основанный на установлении осмотического давления наружного раствора, останавливающего плач. Предполагалось, что плач прекращается, когда уровень осмотического давления окружающего раствора и уровень осмотического давления пасоки становятся равными. Однако последующая экспериментальная проверка показала, что компенсационное давление превышает осмотическое давление пасоки. Избыточное давление, названное активным, энергозависимо. Достоинство компенсационного метода в том, что он достаточно прост и вместе с тем позволяет получить характеристики как осмотических, так и неосмотических свойств корневой системы.

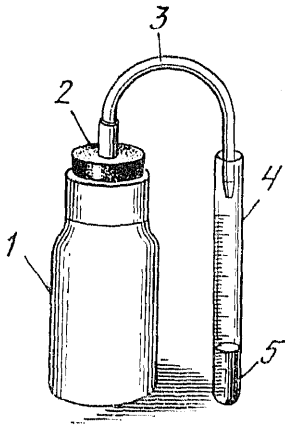
Сопоставление скорости плача с осмотическим давлением пасоки, компенсационным и активным давлением показало, что она наиболее тесно коррелирует с величиной активного давления. Скорость плача составляет 0,5...1,5 мл/ч и зависит прежде всего от развития активной поверхности корневой системы и наличия дыхательного материала в корнях. По объему выделенной пасоки можно судить о функциональной активности корневой системы. Из внешних условий на плач сильное влияние оказывают влажность, аэрация, температура корнеобитаемой среды, концентрация окружающего раствора.

Порядок работы. Подбирают девять одинаково развитых растений и срезают их лезвием безопасной бритвы, оставляя пенек высотой 1...2 см. Пенек при помощи ваты закрепляют в корковой пробке и помещают в баночку с 80 мл водопроводной воды (рис. 6).

На пенек надевают каучуковую трубку соответствующего диаметра, заполняют водой и вставляют в нее

Рис. 6. Установка для сбора пасоки:

1 — стеклянная баночка; 2 — пробка; 3 — толстостенный стеклянный капилляр; 4 — градуированная пробирка; 5 — пасока



дугообразно изогнутый толстостенный стеклянный капилляр. Три баночки ставят в кристаллизатор с водой, нагретой до 35°C , три баночки — на лед и три оставляют при комнатной температуре. За время опыта температура корнеобитаемой среды в первом варианте повышается до 30°C , во втором — снижается примерно до 5°C .

После того как у всех растений начнет выделяться пасока, опускают кончик капилляра в градуированную пробирку, собирают в течение 2 ч пасоку и определяют ее объем. При этом контролируют изменение температуры в баночках. Вычисляют объем пасоки, выделенной за 1 ч.

Снимают с пенька каучуковую трубку, пенек просушивают фильтровальной бумагой и добавляют в среду, окружающую корни, небольшими порциями 1 М раствор сахарозы до прекращения увлажнения поверхности среза пенька (в течение 2 мин). Появляющуюся в ходе определения пасоку удаляют фильтровальной бумагой. При помощи рефрактометра (см. работу 9) определяют осмотическое давление раствора, останавливающего плач.

Для большей надежности данных в исследовательской работе плач останавливают раствором полиэтиленгликоля (молекулярная масса 3000), который представляет собой наиболее индифферентный осмотический агент.

Осмотическое давление пасоки, собранной за время опыта, определяют криоскопическим методом, основанным на снижении температуры замерзания раствора по сравнению с растворителем. Объем пасоки одного растения обычно бывает недостаточно, поэтому для определения осмотического давления объединяют в одну порцию пасоку, собранную со всех растений данной

Рис. 7. Криоскоп:

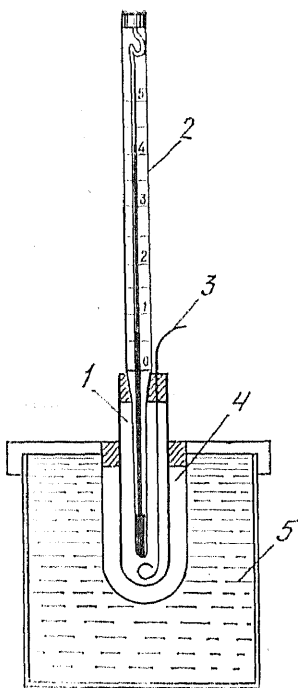
1 — пробирка с исследуемой жидкостью;
2 — термометр Бекмана; 3 — мешалка;
4 — пробирка, создающая воздушную муфту;
5 — охлаждательная смесь

го варианта. Схема криоскопа представлена на рисунке 7.

Для определения понижения температуры замерзания раствора (Δt) измеряют температуру замерзания сначала растворителя, а затем раствора. Так как определяют не абсолютные значения температуры замерзания, а только их разность, то пользуются термометром Бекмана со шкалой на $5 \dots 6^\circ\text{C}$ с делениями $0,01^\circ\text{C}$. Термометр устанавливают так, чтобы при температуре замерзания ртуть находилась в верхней части шкалы.

Для измерения температуры замерзания растворителя пробирку 1 с дистиллированной водой вставляют в пробирку 4 большего диаметра, служащую воздушной муфтой. Обе пробирки помещают в охлаждательную смесь 5 из льда и соли, температура которой минус $23 \dots 24^\circ\text{C}$. В пробке внутренней пробирки осторожно укрепляют термометр Бекмана 2 и мешалку 3. Мешалка свободным кольцом должна охватывать шарик термометра, не касаясь его и стенок пробирки.

По мере охлаждения растворителя ртуть сжимается. При медленном и спокойном охлаждении жидкость переохлаждается, поэтому мениск ртути обычно опускается ниже температуры замерзания. После того как переохлаждение достигает примерно 1°C , жидкость интенсивно встряхивают мешалкой, что вызывает образование кристаллов растворителя. Совместное существование жидкой и твердой фаз наблюдается только при температуре замерзания. Поэтому при встряхивании мениск ртути быстро поднимается и, достигнув темпе-



ратуры замерзания, останавливается. В этот момент при помощи лупы отмечают температуру с точностью до 0,002°C. Затем определяют температуру замерзания пасоки, которую помещают во внутреннюю пробирку.

После некоторого переохлаждения начинается кристаллизация и мениск ртути в термометре поднимается. Поскольку при замерзании раствора вымерзает чистый растворитель, раствор становится более концентрированным, температура замерзания понижается и мениск ртути начинает опускаться. Наивысшую температуру, наблюдаемую после переохлаждения, отмечают как температуру замерзания раствора.

Определение температуры замерзания растворителя и раствора выполняют два-три раза, вычисляют среднее значение и устанавливают разницу между температурами замерзания раствора и растворителя.

Осмотическое давление пасоки рассчитывают по формуле:

$$P = \frac{RT}{E} \Delta t,$$

где P — искомое осмотическое давление, кПа; R — универсальная газовая постоянная [8,31 Дж/(моль·К)]; T — абсолютная температура замерзания воды (273 К); E — криоскопическая постоянная (для воды — 1,86 °C); Δt — разность между температурой замерзания растворителя и раствора, °C.

13. Определение скорости и движущей силы плача

Условия опыта	Повторность	Скорость плача		Компенсационное давление		Осмотическое давление пасоки		Активное давление	
		мл/ч	%	кПа	%	кПа	%	кПа	%
Комнатная температура	1								
	2								
	3								
	Среднее		100		100		100		100
Повышение температуры до 30 °C	4								
	5								
	6								
	Среднее								
Снижение температуры до 5 °C	7								
	8								
	9								
	Среднее								

Подставляя значения известных величин, получим:

$$P = \frac{8,31 \cdot 273}{1,86} \Delta t = 1215 \cdot \Delta t.$$

По разнице между компенсационным давлением и осмотическим давлением пасоки находят величину активного давления, характеризующего движущую силу плача. Вычисляют средние по вариантам: скорость плача и показатели корневого давления, выражают эти величины в процентах их уровня при комнатной температуре. Делают выводы по результатам опыта. Результаты опыта записывают по форме (табл. 13).

Материалы и оборудование. Трехнедельные растения подсолнечника, выращенные в водной культуре, 1 М раствор сахарозы.

Рефрактометры, лезвия безопасной бритвы, термометры, лупы, каучуковые трубки длиной 3...4 см, сосуды на 100 мл с корковыми пробками, капилляры, градуированные пробирки, пипетки на 10 мл, криоскопы, кристаллизаторы или металлические бани, вата, марля, лед.

Работа 23. ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА 2,4-Д* НА НАГНЕТАТЕЛЬНУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ

Вводные пояснения. 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) относится к группе веществ с высокой физиологической активностью. В зависимости от дозы, продолжительности воздействия и чувствительности растений она стимулирует или тормозит физиологические процессы.

При обработке надземных частей растений 2,4-Д передвигается в корневую систему и вызывает там изменение метаболизма и скорости энергозависимых процессов. При использовании препарата в небольших концентрациях (0,02%-й раствор натриевой соли 2,4-Д для двудольных растений) наблюдается двухфазная ответная реакция корней на обработку: первые двое суток стимулирование, затем — подавление деятельности корневой системы.

В качестве характеристики нагнетательной деятельности корневой системы может быть использована ско-

* Препараты группы 2,4-Д запрещено применять в пределах санитарной зоны вокруг рыбохозяйственных водоемов (на расстоянии 500 м от границы затопления при максимальном стоянии паводковых вод, но не ближе 2 км от существующих берегов).

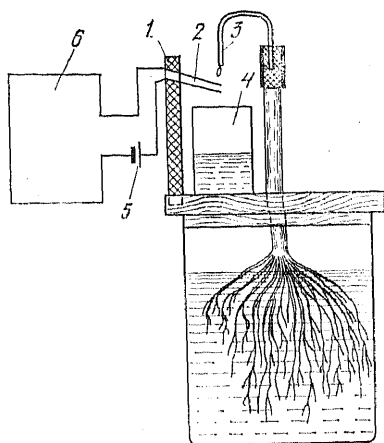


Рис. 8. Схема установки для автоматической регистрации скорости выделения пасоки: 1 — эбонитовый держатель; 2 — игольчатые электроды; 3 — изогнутая игла от шприца; 4 — стакан; 5 — источник постоянного тока; 6 — самописец

рость выделения пасоки срезанным растением. Профессор И. И. Гунар и Л. А. Паничкин предложили простой и надежный способ автоматической регистрации скорости плача, основанный на замыкании электрической

цепи падающей каплей пасоки и записи этого момента на самописце.

Порядок работы. Для работы в водной культуре на 0,5 нормы питательной смеси Кнопа выращивают двухнедельные растения подсолнечника и разделяют их на три группы. Первую группу растений опрыскивают 0,02%-м раствором натриевой соли 2,4-Д (1 мл раствора на одно растение) за 72 ч до наблюдения. Растения второй группы опрыскивают тем же раствором за 36 ч до наблюдения, а третьей — дистиллированной водой с тем же расходом жидкости на одно растение.

В день наблюдения растения срезают лезвием безопасной бритвы, оставляя пенек высотой 3...4 см. Плач наблюдают в тех же сосудах и на тех же растворах, на которых выращивали растения (рис. 8).

К пеньку при помощи эластичной резиновой трубки присоединяют иглу от шприца 3 для вытекания пасоки. На пути падающей в стакан 4 капли укрепляют в наклонном положении на эбонитовом держателе 1 два игольчатых электрода 2. В качестве электродов могут быть использованы проволоки из нержавеющей стали или тонкие иглы от шприца, включенные в электрическую цепь с источником постоянного тока 5 (элементом Юпитер М) и высокоомным самописцем 6 постоянного тока — Туре, ОН-814.

Включают самописец в сеть. Дают прибору прогреться в течение 10 мин, нажимают красную кнопку

с обозначением «ON» на задней панели прибора. На передней панели устанавливают чувствительность прибора 1 В и скорость движения ленты самописца 15 см/ч. Нажимают кнопку с обозначением «Start».

Падающая капля, на мгновение замыкает электрическую цепь между электродами, вызывает кратковременное отклонение пера самописца. При необходимости длительной записи плача пенек с системой для сбора пасоки и электродами во время опыта накрывают стеклянным колпаком, обернутым изнутри влажной фильтровальной бумагой для предотвращения испарения воды в момент образования капли и подсыхания ее на электродах.

Скорость выделения пасоки у растений каждого варианта записывают в течение 30 мин. По окончании работы кнопки самописца переводят в исходное положение и выключают прибор из сети. Анализ записей самописца позволяет выявить разницу в скорости плача по вариантам опыта.

Для расчета абсолютных величин скорости плача определяют объем капли. Для этого собирают 100 капель в маленькие градуированные пробирки и рассчитывают среднюю величину капли. Объем одной капли пасоки зависит от размеров полости иглы, через которую вытекает капля, и составляет 0,02...0,05 мл (во всех вариантах опыта это будет одна и та же величина).

Рассчитывают по вариантам среднее расстояние между пятью штрихами на ленте и находят время образования четырех капель пасоки. При скорости движения ленты самописца 15 см/ч каждый сантиметр

14. Определение скорости выделения пасоки

Вариант	Объем капли пасоки, мл	Расстояние между штрихами на ленте, мм		Скорость движения ленты самописца, см/ч	Время падения пяти капель пасоки, мин	Скорость подачи пасоки, мл/мин
		отдельные отсчеты	среднее			

Контроль
После опрыскивания
растений 2,4-Д через:

36 ч
72 ч

расстояния на ленте соответствует 4 мин. Определяют время образования одной капли и, умножив эту величину на объем, рассчитывают скорость плача в микролитрах в минуту на одно растение.

Результаты опыта записывают по форме (табл. 14).

Материалы и оборудование. Двухнедельные растения подсолнечника, 0,02%-й раствор натриевой соли 2,4-Д. Пульверизатор, установка для автоматической регистрации плача.

Работа 24. СРАВНЕНИЕ ТРАНСПИРАЦИИ ВЕРХНЕЙ И НИЖНЕЙ СТОРОН ЛИСТА ХЛОРКОБАЛЬТОВЫМ МЕТОДОМ ПО ШТАЛЮ

Вводные пояснения. Метод хлоркобальтовой пробы основан на изменении цвета фильтровальной бумаги, пропитанной хлоридом кобальта, при поглощении ею паров воды, испаряемых поверхностью листа. По времени, необходимому для перехода окраски хлоркобальтовой бумаги из голубой (цвет сухого CoCl_2) в розовую (цвет $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), судят о транспирации растений.

Хлоркобальтовый метод определения транспирации в поле листьев, не отделенных от растения, очень прост и доступен. Однако его применение ограничено только сравнительными опытами, так как не позволяет определять абсолютные величины интенсивности транспирации. Существуют количественные модификации этого метода, основанные на взвешивании хлоркобальтовой бумаги до и после определенной экспозиции ее на листе, но они не отличаются точностью.

Порядок работы. Диски из хлоркобальтовой бумаги на целлюлоидной подложке прикладывают к верхней и нижней сторонам листа и укрепляют подложку канцелярской скрепкой (рис. 9). Наблюдают, через сколько минут порозовеет бумажка на верхней и нижней сторо-

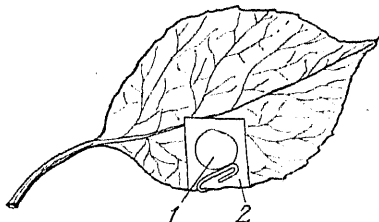


Рис. 9. Определение транспирации хлоркобальтовым методом:

1 — хлоркобальтовая бумажка; 2 — целлюлоидная подложка

нах листа. По скорости порозовения определяют, с какой стороны листа испарение идет быстрее.

По окончании опыта исследуют под микроскопом эпидермис верхней и нижней сторон листа и подсчитывают количество устьиц в поле зрения. Для этого рассматривают по три — пять полей зрения на трех препаратах каждого варианта и вычисляют среднее арифметическое.

Зарисовывают эпидермис верхней и нижней сторон листа. Делают выводы о причинах различной интенсивности испарения сторон листа данного растения и о соотношении между устьичной и кутикулярной транспирацией. Результаты опыта записывают по форме:

Сторона листа	Период наблюдения		Период, за который поро- зовеет бумага, мин	Число устьиц в поле зрения микроскопа	
	начало опыта	конец опыта		отдельные подсчеты	среднее арифме- тическое

Верхняя
Нижняя

Материалы и оборудование. Трехнедельные растения фасоли. Диски из хлоркобальтовой бумаги на целлулоидной подложке, канцелярские скрепки, часы, микроскопы, стекла предметные и покровные, пинцеты, капельницы с водой, лезвия безопасной бритвы, препаровальные иглы.

Приготовление хлоркобальтовой бумаги. Берут равномерную по толщине фильтровальную бумагу или обеззоленные тонкие фильтры и намачивают в кювете с раствором хлорида кобальта, приготовленного по Камерлингу (в 100 мл воды растворяют 6,7 г $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ и 2,64 г NaCl), в течение минуты, а затем высушивают в подвешенном состоянии на стеклянных палочках до появления голубого цвета. Из бумаги вырезают кружочки диаметром 1 см и при помощи полиэтиленовой ленты с клейким слоем приклеивают по две к целлулоидной подложке.

Хранят целлулоидные камеры с хлоркобальтовой бумагой в эксикаторе над хлоридом кальция.

Работа 25. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ТРАНСПИРАЦИИ И ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ТРАНСПИРАЦИИ ПРИ ПОМОЩИ ТЕХНИЧЕСКИХ ВЕСОВ

Вводные пояснения. *Интенсивность транспирации* — количество воды, испарившейся с единицы листовой поверхности в единицу времени. Величина ее зависит от внешних факторов, времени суток и колеблется в пределах 15...250 г/(м²·ч).

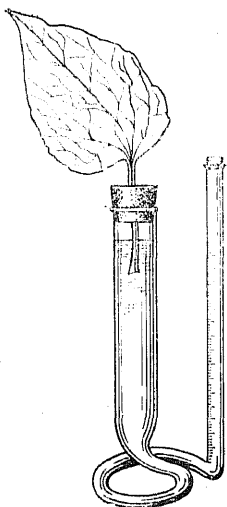


Рис. 10. Прибор Веска

Основной метод определения интенсивности транспирации — весовой, основанный на учете потери воды при испарении. Этим методом можно изучать транспирацию целого растения или отдельных его частей. Работа с интактными растениями представляет значительные трудности, поэтому чаще пользуются срезанными побегами или листьями. Чтобы во время опыта оводненность тканей не снижалась, их помещают в прибор Веска, заполненный водой.

Относительная транспирация — отношение интенсивности транспирации к интенсивности испарения со свободной водной поверхности при тех же условиях. Этот показатель характеризует способность растений регулировать транспирацию и обычно составляет 0,1...0,5, поднимаясь иногда до 1 и опускаясь у некоторых хорошо защищенных от потери воды листьев до 0,01 и ниже.

Порядок работы. С растения подсолнечника срезают лист вместе с черешком. Черешок плотно укрепляют ватой в отверстии каучуковой пробки. Нижний конец черешка подрезают наискось под водой примерно на 1 см для восстановления водных нитей в проводящих сосудах. Вставляют пробку с листом в прибор Веска, наполненный водой комнатной температуры так, чтобы черешок листа был погружен в воду (рис. 10). Смонтированный прибор Веска должен быть совершенно сухим, плотно закрытым; пробка не должна касаться воды. Готовят два прибора Веска, взвешивают их на технических весах, и, снабдив этикетками, помещают один в темную камеру, другой на прямой свет. Через час взвешивают повторно. По разнице с первоначальной массой устанавливают количество воды, которое испарил лист за время опыта.

На основании полученных результатов рассчитывают интенсивность транспирации, т. е. количество воды в граммах, которое испаряет единица листовой поверхности (1 м^2) в единицу времени (1 ч). Чтобы вы-

полнить расчет, нужно знать площадь листа, взятого для опыта. При ее определении можно использовать весовой метод. Вырезают из бумаги квадрат размером 100 см^2 ($10 \times 10\text{ см}$) и взвешивают.

На другой лист такой же бумаги кладут исследуемый лист растения, тщательно обводят его контур остро отточенным карандашом, вырезают по контуру и также взвешивают. Составляют пропорцию: если квадрат бумаги в 100 см^2 имеет массу A г, а кусочек бумаги, вырезанный по контуру листа, площадью S — B г, искомую площадь листа можно найти следующим образом:

$$S = 100 \cdot B / A. \quad (1)$$

Интенсивность транспирации [$\text{г}/(\text{м}^2 \cdot \text{ч})$] рассчитывают по формуле

$$T = \frac{10\,000 \cdot C}{St}, \quad (2)$$

где C — убыль в массе за время опыта, г; S — площадь листа, см^2 , t — продолжительность опыта, ч.

Параллельно в тех же условиях определяют испарение со свободной водной поверхности. Для этого учитывают количество воды, испарившееся за 1 ч с поверхности чашки Петри. Определив внутренний диаметр чашки Петри, вычисляют ее площадь по формуле

$$S = \pi r^2. \quad (3)$$

Рассчитывают интенсивность испарения (E) со свободной водной поверхности, пользуясь формулой (2), и вычисляют величину относительной транспирации (ОТ):

$$\text{ОТ} = T/E.$$

Сравнивают полученные величины и делают выводы о зависимости интенсивности транспирации и относительной транспирации от условий освещения и способности растений регулировать транспирацию. Результаты опыта записывают по форме (табл. 15).

Материалы и оборудование. Трехнедельные растения подсолнечника.

Технические весы, кристаллизатор, часы, приборы Веска, чашки Петри, пожницы, бумага, линейки, вата.

15. Определение интенсивности транспирации и относительной транспирации

Условия пыта	Транспирация					Интенсив- ность тран- спирации, г/(м ² ·ч)
	масса прибора с листом, г		убыль массы, г	площадь листа, см ²	продолжи- тельность опыта, ч	
	в начале опыта	в конце опыта				

Продолжение

Условия опыта	Испарение с поверхности воды					Интен- сивность испаре- ния, г/(м ² ·ч)	Относительная транспи- рация
	масса чашки Петри с водой, г		убыль массы, г	площадь испаряю- щей по- верхности, см ²	продл- житель- ность опыта, ч		
	в начале опыта	в конце опыта					

Работа 26. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ТРАНСПИРАЦИИ У СРЕЗАННЫХ ЛИСТЬЕВ ПРИ ПОМОЩИ ТОРЗИОННЫХ ВЕСОВ ПО ИВАНОВУ

Вводные пояснения. Метод основан на учете изменений массы срезанного транспирирующего листа за короткие промежутки времени, что дает возможность наблюдать транспирацию при том состоянии насыщения листа водой, в каком он находился на растении.

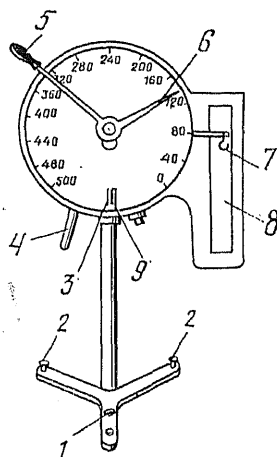
Интервал между взвешиваниями не должен превышать 5 мин. При более длительной экспозиции уменьшается содержание воды в листе и снижается интенсивность транспирации. Для быстрого взвешивания используют торзионные весы.

Порядок работы. Устанавливают торсионные весы (рис. 11) строго горизонтально по уровню 1 при помощи двух винтов 2 на подставке. Проверяют нулевую точку: устанавливают указатель массы 6 рычагом натяжения 5 в положение «0», освобождают коромысло весов передвижением закрепительного рычага 4 вправо, при этом указатель равновесия 9 должен совместиться с чертой равновесия 3. Закрывают весы передвижением закрепительного рычага 4 влево.

Затем приступают к взвешиванию. На крючок коромысла 7, находящийся сбоку весов в закрытой камере

Рис. 11. Торзионные весы:

1 — уровень; 2 — винты; 3 — черта равновесия; 4 — закрепительный рычаг; 5 — рычаг натяжения; 6 — указатель массы; 7 — крючок коромысла; 8 — закрытая камера; 9 — указатель равновесия



8, подвешивают другой крючок и определяют его массу. Для этого освобождают коромысло весов передвижением закрепительного рычага 4 вправо. Поворачивают указатель массы 6 рычагом натяжения 5 влево до совмещения указателя равновесия 9 с чертой равновесия 3. В таком положении указатель массы показывает на шкале массу груза. Поворачивают закрепительный рычаг влево (стрелка показывает «закрыто») и возвращают указатель массы к нулевому делению на шкале.

Затем определяют интенсивность транспирации. Срезают лист, надевают на крючок и подвешивают на коромысло весов. Быстро взвешивают и помещают лист на наколку. Таким образом взвешивают листья одного и того же яруса с десяти растений. Через 5 мин после взвешивания первого листа повторно взвешивают все листья в первоначальном порядке.

Массу листьев определяют вычитанием из показаний шкалы массы крючка. Убыль в массе листьев за время между первым и вторым взвешиванием показывает, сколько воды испарилось за этот период. Все расчеты выполняют по суммарной массе десяти листьев каждого варианта.

16. Определение интенсивности транспирации срезанных листьев

Вариант	Масса листьев, мг	Повторность										Суммарная масса десяти листьев, мг	Потеря воды десяти листьями, мг	Интенсивность транспирации, мг/(г·ч)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			

Контроль Начальная
Через 5 мин

Сухой теплый ветер Начальная
Через 5 мин

Рассчитывают количество воды, испарившейся из 1 г сырых листьев за 1 ч. Определяют интенсивность транспирации в комнатных условиях (контроль) и при сухом теплом ветре (с использованием фена). Результаты опыта записывают по форме (табл. 16).

Материалы и оборудование. Десятидневные проростки овса или пшеницы. Торсионные весы, фены, счетные машины «Электроника», ножницы, подставки для подвешивания листьев.

**Работа 27. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ТРАНСПИРАЦИИ
ПРИ ПОМОЩИ ЭЛЕКТРОННОГО
ТРАНСПИРОМЕТРА КОНСТРУКЦИИ
А. П. ВАГАНОВА**

Вводные пояснения. Метод основан на изменении электрической проводимости гигродатчика при поглощении им испаряемых листом паров воды.

Чувствительным элементом в используемом датчике служит цеолиталюмосиликат с высокой пористостью (размеры пор 0,3...5 нм). Заполнение капилляров цеолита водяным паром уменьшает его электрическое сопротивление. Гигристор заключен в камеру-прищепку и присоединен к одному из плеч измерительного моста, питаемого переменным током частотой порядка 1 кГц. Изменение силы тока в цепи регистрируется миллиамперметром.

Интенсивность транспирации обратно пропорциональна времени, за которое стрелка миллиамперметра пройдет от начала до конца шкалы прибора при определении транспирации. Поэтому интенсивность транспирации можно выразить в делениях шкалы прибора, которые пройдет стрелка миллиамперметра за 1 с:

$$T = 100/t,$$

где t — время, с; 100 — число делений шкалы прибора.

Полученные по формуле величины интенсивности транспирации сопоставимы, если измерения выполняли при одинаковых настройке чувствительности прибора, температуре и влажности воздуха, с одним и тем же датчиком и камерой-прищепкой. Интенсивность транспирации в контроле принимают за 100 %. Интенсивность транспирации в опытных вариантах выражают в процентах контроля.

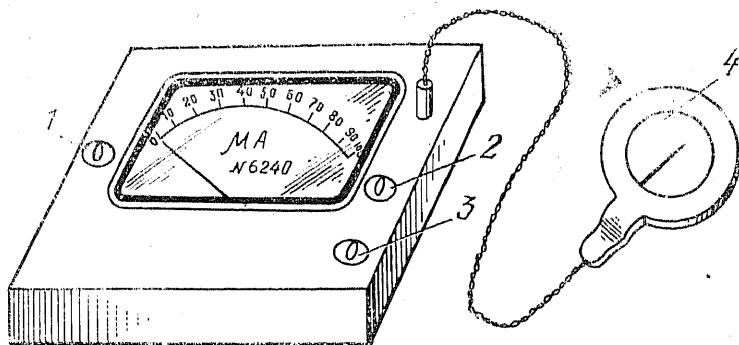


Рис. 12. Электронный транспи-
рометр:

1, 2 — тумблеры; 3 — ручка установки
силы тока; 4 — камера-прищепка с
гигристором

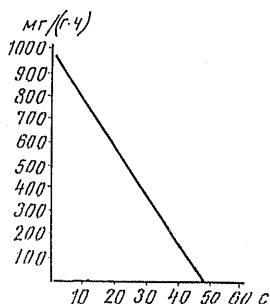


Рис. 13. График для определения
интенсивности транспирации

Для определения интенсивности транспирации в абсолютных величинах прибор калибруют, одновременно определяя интенсивность транспирации при помощи гигристора и весовым методом. Линейная зависимость между скоростью транспирации и изменением электрического сопротивления цепи наблюдается в интервале 20...70 мА. Поэтому при калибровке прибора необходимо определять в секундах время прохождения стрелкой транспиromетра именно этого интервала.

Порядок работы. Тумблером 1 (рис. 12) включают источник питания и устанавливают ручкой 3 силу тока, которая определяет чувствительность прибора так, чтобы стрелка миллиамперметра указывала 80 мА. Приводят прибор тумблером 2 в рабочее состояние, при этом стрелка миллиамперметра возвращается в нулевое положение.

Камеру-прищепку с гигристором 4 укрепляют на исследуемом листе, ждут, когда стрелка миллиамперметра дойдет до деления 20 мА, и включают секундомер.

Отмечают время, за которое стрелка миллиамперметра пройдет по шкале до 70 мА. Снимают камеру-прищепку с листа и держат ее раскрытой несколько секунд. За это время гигристор приходит в равновесие с окружающей средой. Стрелка миллиамперметра возвращается в нулевое положение, прибор готов к следующему определению. На одном и том же листе делают три определения и вычисляют среднее время (в секундах) отклонения стрелки на 50 делений. По графику (рис. 13) определяют, какому значению интенсивности транспирации [мг/(г·ч)] соответствует эта величина.

Используя описанный метод, определяют интенсивность транспирации листьев разных ярусов контрольных и обработанных антитранспирантами растений. Результаты записывают по следующей форме:

Вариант	Время, с				Интенсивность транспирации, мг/(г·ч)
	1	2	3	среднее	

Материалы и оборудование. Четырехнедельные растения подсолнечника или фасоли, транспирометры, секундомеры, пленочные антитранспиранты.

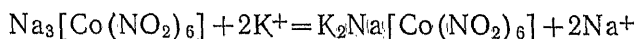
Работа 28. НАБЛЮДЕНИЕ ЗА ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕМ КАЛИЯ ПРИ ДВИЖЕНИИ УСТЬИЦ

Вводные пояснения. Движение устьиц обусловлено особенностями их анатомического строения. Устьица состоят из двух замыкающих клеток полулунной или бобовидной формы, внутренние стенки которых утолщены, а наружные — тонкие. При насыщении замыкающих клеток водой наружные стенки сильно растягиваются, кривизна замыкающих клеток увеличивается и устьичная щель открывается. В случае потери воды замыкающие клетки выпрямляются и устьичные щели закрываются. В основе динамики тургора замыкающих клеток лежит изменение их осмотического давления.

Согласно «крахмальной» теории устьичной регуляции, господствовавшей в науке на протяжении многих десятилетий, изменение осмотического давления происходит за счет обратимых превращений в системе крахмал-сахар. Однако в последнее время достаточно убе-

дительно показано, что ведущую роль в этом процессе играет работа калиевых ионных насосов, обеспечивающих перераспределение калия между замыкающими клетками устьиц и соседними эпидермальными клетками. Увеличение осмотического давления в замыкающих клетках при открывании устьиц связано с поступлением в них калия, закрывание устьиц происходит при выходе калия из замыкающих клеток. Поэтому в открытых устьицах замыкающие клетки намного богаче ионами калия, чем в закрытых. Эти различия можно выявить гистохимически кобальтнитритным методом.

Метод основан на взаимодействии кобальтнитрита натрия с ионами калия в ткани:



При этом образуется желтый кристаллический осадок соли $\text{K}_2\text{Na}[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$. Для более четкого обнаружения препарат обрабатывают сульфидом аммония, что приводит к образованию в местах локализации калия коричневого осадка сульфида кобальта.

Порядок работы. Удобным объектом для наблюдения служит традесканция, листья которой имеют хорошо развитый устьичный комплекс. Можно использовать также листья овса, кукурузы, бобов и др. Для работы необходимо иметь растения с широко открытыми и плотно закрытыми устьицами. Поэтому перед началом опыта одну часть растений поливают и выставляют на яркий свет на 1,5...2 ч, другую — выдерживают в темноте до полного закрывания устьиц.

Полностью открытые устьица можно также получить на листовых сегментах. Для этого за 1 ч до опыта нарезают полоски листа и помещают их в освещенные настольной лампой чашки Петри с водопроводной водой.

На нижней стороне подготовленных к опыту листьев или сегментов острой бритвой под прямым углом к центральной жилке делают поверхностные надрезы через 2...3 мм и срезают в этом же направлении небольшие участки эпидермиса.

Подготовленные эпидермальные полоски помещают на 1...2 мин в чашки Петри с охлажденной бидистиллированной водой с тем, чтобы удалить внеклеточный калий; затем переносят на 5 мин в бюкс с охлажденной инкубационной средой и промывают в чашке Петри охлажденной бидистиллированной водой 2...3 мин.

Так как кристаллы натриево-калиевой соли кобальтоазотистой кислоты при комнатной температуре относительно растворимы, чашки Петри с водой и бюкс с инкубационной средой помещают в сосуд со снегом или льдом. Подготовленные препараты просматривают под микроскопом в смеси 50%-го глицерина и насыщенного раствора сульфида аммония (1:1).

Зарисовывают локализацию калия в замыкающих и прилегающих к ним клетках эпидермиса при открытых и закрытых устьицах.

Материалы и оборудование. Растения традесканции или семидесятидневные проростки овса, кукурузы, бобов и других сельскохозяйственных культур, среда инкубации, бидистиллированная вода, 50%-й глицерин, насыщенный раствор сульфида аммония.

Микроскопы, предметные и покровные стекла, сосуды со снегом или льдом, лезвия безопасной бритвы, чашки Петри, бюксы, стеклянные палочки.

Приготовление среды инкубации. Растворяют 20 г нитрата кобальта и 35 г нитрата натрия в 75 мл подкисленной бидистиллированной воды (10 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 75 мл бидистиллятом). Смесь фильтруют и доводят бидистиллятом до 100 мл.

Работать лучше со свежеприготовленной смесью. При необходимости ее можно хранить в холодильнике в течение месяца.

Работа 29. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТОЯНИЯ УСТЬИЦ МЕТОДОМ ИНФИЛЬТРАЦИИ ПО МОЛИШУ

Вводные пояснения. Причиной устьичных движений может быть действие света, изменение осмотической напряженности тканей, температуры, концентрации CO_2 в межклетниках и др. В условиях недостаточного водообеспечения происходит гидроактивное закрывание устьиц. Причем они начинают постепенно закрываться еще до проявления каких-либо внешних признаков водного дефицита. Поэтому степень открытости устьиц может быть физиологическим показателем для определения обеспеченности растений водой и установления сроков полива.

Определение состояния устьиц методом инфильтрации основано на способности жидкостей, смачивающих клеточные стенки, проникать через открытые устьичные щели в ближайшие межклетники, вытесняя из последних воздух. При инфильтрации межклетников соответствующие участки листа становятся прозрачными.

В качестве инфильтрующих растворов берут органические жидкости, обладающие различной вязкостью и неодинаковой способностью смачивать клеточные стен-

ки и поэтому по-разному проникающие через устьичные отверстия в межклетники. Относительно легко проникает ксилол, труднее — бензол, еще труднее — спирт. Разная способность этих жидкостей проникать в устьичные щели дает возможность определить степень открытости устьиц.

Порядок работы. Исследуют состояние устьиц у растений, находящихся в условиях оптимального и недостаточного водоснабжения. На соседние участки нижней стороны листа наносят последовательно спирт, бензол и ксилол. Выдерживают лист в горизонтальном положении до полного исчезновения капель, которые могут либо испариться, либо проникнуть внутрь листа, и рассматривают его в проходящем свете. Если жидкость проникла в межклетники листа, то на нем появляются прозрачные пятна. Знаком плюс в схеме отмечают проникновение жидкости, знаком минус — отсутствие инфильтрации.

На основании полученных данных делают заключение о разной степени раскрытия устьиц, исходя из того, что при инфильтрации только ксилолом они открыты слабо, ксилолом и бензолом — средние, ксилолом, бензолом и спиртом — сильно.

Результаты опыта записывают по следующей форме:

Условия опыта	Проникновение			Степень раскрытия устьиц
	спирта	бензола	ксилора	

Материалы и оборудование. Десяти-пятнадцатидневные растения подсолнечника, капустницы, спирт, бензол, ксилол.

Работа 30. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ РАСКРЫТИЯ УСТЬИЦ НА ФИКСИРОВАННОМ ЭПИДЕРМИСЕ ПО ЛЛОЙДУ

Вводные пояснения. Метод заключается в быстром обезвоживании и фиксации снятого эпидермиса в абсолютном спирте и последующем его исследовании под микроскопом.

Порядок работы. Наблюдают за движением устьиц у десятидневных проростков злаков при переносе их из светлого помещения в темную камеру. Наблюдение вы-

полняют сначала на свету, а затем после пребывания растений в темной камере 30 мин и 2 ч.

На нижней стороне листа под прямым углом к центральной жилке делают неглубокие надрезы бритвой через 2...3 мм и срезают в этом направлении полоску эпидермиса. Помещают ее в склянку с абсолютным спиртом, который быстро фиксирует снятый эпидермис и предохраняет его от дальнейшей деформации. Материал можно хранить в спирте долгое время.

Просматривают фиксированный эпидермис под микроскопом, измеряют ширину устьичных щелей не менее чем у 20 устьиц и вычисляют среднюю величину степени их открытия. Измерения выполняют при помощи окуляра-микрометра, который представляет собой круглую стеклянную пластинку с нанесенной шкалой. Окуляр-микрометр вставляют в окуляр. Перемещают объект препаратом и шкалу микрометра поворотом окуляра так, чтобы можно было измерить объект в делениях окуляра-микрометра.

Для выражения ширины устьичных щелей в микрометрах необходимо определить цену деления окуляра-микрометра. Для этого на столик микроскопа помещают объект-микрометр со шкалой длиной 1 мм и величиной одного деления — 100 мкм. Совмещают направление и нулевые точки шкалы окуляра-микрометра и объекта-микрометра. Находят количество делений объекта-микрометра (A), точно соответствующее количеству делений окуляра-микрометра (B). Вычисляют цену деления окуляра-микрометра:

$$C = 10A/B.$$

Для получения истинных размеров устьичных щелей умножают их ширину в делениях окуляра-микрометра на цену деления. Результаты опыта записывают по форме (табл. 17).

17. Определение степени раскрытия устьиц

Вариант	Цена деления окуляра-микрометра, мкм	Ширина устьичных щелей	
		в делениях окуляра-микрометра	в микрометрах

На свету
После пребывания растений
в темной камере в течение:
30 мин
2 ч

Делают вывод о влиянии света на устьичный аппарат растений.

Материалы и оборудование. Десятидневные проростки овса или пшеницы, абсолютный спирт.

Микроскопы, окуляры-микрометры, объекты-микрометры, предметные и покровные стекла, пинцеты, препаровальные иглы, маленькие склянки с притертыми пробками или бюксы, лезвия.

Работа 31. ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ УСТЬИЦ МЕТОДОМ ОТПЕЧАТКОВ ПО ПОЛАЧЧИ

Вводные пояснения. Метод основан на получении тонкой прозрачной пленки с отпечатками (репликами) устьиц. Рассматривая их под микроскопом, можно определить число устьиц на единице листовой поверхности и их размер. Для изготовления реплик применяют вещества, образующие пленку при испарении растворителя или в результате полимеризации. Действие самих органических растворителей и охлаждение листа в результате их испарения могут влиять на апертуру устьиц. Использование полимеров снижает артефакты.

Порядок работы. На нижнюю поверхность листа стеклянной палочкой наносят тонкий слой раствора силиконового каучука, смешанного с катализатором, и оставляют для полимеризации на 2...3 мин. «Негатив» снимают с листа пинцетом, покрывают бесцветным лаком и дают высохнуть. Таким образом на лаковой пленке, которая легко снимается со слепка, получают позитивное изображение листа. Пленку помещают в каплю воды на предметное стекло, накрывают покровным и рассматривают под микроскопом с объективом $\times 40$. Определяют среднее число устьиц в поле зрения микроскопа, исследовав несколько полей зрения в разных участках препарата.

Затем при помощи окуляра-микрометра (см. работу 30) находят среднюю площадь устьичной щели и площадь поля зрения микроскопа. Для этого измеряют ширину и длину устьичной щели не менее чем у 20 устьиц и устанавливают среднюю величину. Площадь устьичной щели вычисляют по формуле

$$S = \pi ab,$$

где a и b — малая и большая полуоси эллипса, т. е. половина ширины и длины устьичной щели.

По числу устьиц и средней площади устьичной щели рассчитывают общую площадь устьичных отверстий в поле зрения микроскопа. Измеряют диаметр поля зрения, вычисляют радиус и определяют площадь поля по формуле: $S = \pi r^2$. Рассчитывают площадь, занимаемую всеми устьичными отверстиями, в процентах общей поверхности листа.

Методом отпечатков исследуют листья разных ярусов одного и того же растения, а затем делают вывод о влиянии ярусности на размеры испаряющей поверхности листа. Результаты опыта записывают по форме (табл. 18).

18. Определение состояния устьиц у подсолнечника

Ярус листьев	Число устьиц в поле зрения микроскопа	Цена деления окуляра-микрометра, мкм	Размеры устьичных отверстий					Общая площадь устьичных отверстий в поле зрения, мкм ²	Площадь поля зрения, мм ²	Площадь устьичных отверстий, % общей поверхности листа
			в делениях окуляра-микрометра		в микрометрах					
			ширина	длина	ширина	длина	площадь			

Материалы и оборудование. Пятнадцатидневные растения подсолнечника, раствор коллодия или кремнийорганический каучук и катализатор, используемые stomatологами, бесцветный лак для ногтей.

Микроскопы, окуляры-микрометры, объекты-микрометры, предметные и покровные стекла, пинцеты, кисточки.

Работа 32. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДНОГО ДЕФИЦИТА РАСТЕНИЙ

Вводные пояснения. Недостаток влаги в почве и воздухе нарушает водообмен у растений. Снижение водности тканей изменяет состояние биокolloидов клетки, что приводит к повреждению тонкой структуры протопласта, существенным сдвигам в состоянии и деятельности всех ферментных систем и, как следствие всего перечисленного, к нарушению обмена веществ. Умень-

шение содержания воды в растении вызывает резкое падение продуктивности фотосинтеза; интенсивность дыхания возрастает, но нарушается сопряженность окисления и фосфорилирования, в результате чего сильно снижается энергетическая эффективность дыхания.

Показателями напряженности водного режима растений служат водный дефицит и дефицит относительной тургесцентности ткани. В обоих случаях сравнивают содержание воды в растительной ткани с количеством ее в той же ткани, находящейся в состоянии полного тургора.

Для полного насыщения клеток влагой листья выдерживают в воде или увлажненной атмосфере. Общее содержание воды определяют высушиванием листьев при 100...105°C.

Под водным дефицитом понимают недостающее до полного насыщения клеток количество воды, выраженное в процентах общего ее содержания при полном насыщении ткани.

В природных условиях полное насыщение листьев водой практически не наблюдается. В большинстве случаев водный дефицит у растений колеблется от 10 до 35 %.

Этот показатель хорошо коррелирует с водообеспеченностью растений и может быть использован для характеристики водного режима.

Порядок работы. Берут растения подсолнечника или кукурузы, выращенные на почвах с неодинаковой влажностью.

Сверлом диаметром 8 мм делают 20 высечек листа, стараясь не попадать на крупные жилки. Диски взвешивают на аналитических весах, помещают на поверхность воды в закрытые чашки Петри и оставляют для насыщения ткани водой на 2 ч. Тургесцентные высечки из листьев просушивают снаружи фильтровальной бумагой и взвешивают. Для контроля диски вновь помещают в воду и через 30 мин взвешивание повторяют.

Если масса ткани не изменится, значит она полностью насыщена водой. После определения массы ткани, полностью насыщенной водой, определяют массу абсолютно сухой ткани (порядок определения см. в рабо-

те 21). На основании полученных данных вычисляют показатели водообеспеченности растений:

$$\text{Водный дефицит} = \frac{\left(\begin{array}{c} \text{количество воды,} \\ \text{насыщающее орган} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{исходное содержание} \\ \text{воды} \end{array} \right)}{\text{количество воды, насыщающее орган}} \cdot 100.$$

Относительная тургесцентность — величина, показывающая, какую долю в процентах составляет исходное количество воды от ее содержания, обеспечивающего полный тургор:

$$\text{Относительная тургесцентность} = \frac{(\text{масса сырой ткани}) - (\text{масса сухой ткани})}{\left(\begin{array}{c} \text{масса тургесцентной} \\ \text{ткани} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{масса сухой} \\ \text{ткани} \end{array} \right)} \cdot 100.$$

Величина, показывающая, сколько воды необходимо для достижения листьями растений тургесцентного состояния, называется дефицитом относительной тургесцентности:

$$\text{Дефицит относительной тургесцентности} = 100 - \frac{(\text{масса сырой ткани}) - (\text{масса сухой ткани})}{\left(\begin{array}{c} \text{масса тургесцентной} \\ \text{ткани} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{масса сухой} \\ \text{ткани} \end{array} \right)} \cdot 100.$$

Результаты опыта записывают по форме (табл. 19).

19. Определение водообеспеченности растений

Вариант	Номер бюкса	Масса бюкса, г	Навеска листьев, г	Масса тургесцентной ткани, г	Масса абсолютно сухой ткани, г	Исходное содержание воды, г	Количество воды, насыщающее листья, г	Показатели водообеспеченности, %		
								водный дефицит	относительная тургесцентность	дефицит относительной тургесцентности

Материалы и оборудование. Десяти-пятнадцатидневные растения подсолнечника или кукурузы.

Аналитические весы, сушильный шкаф, бюксы, эксикаторы, щипцы, пробочные сверла, резиновые пластинки, кристаллизаторы, фильтровальная бумага.

**Работа 33. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОУДЕРЖИВАЮЩЕЙ
СПОСОБНОСТИ РАСТЕНИЙ
МЕТОДОМ «ЗАВЯДАНИЯ» ПО АРЛАНДУ**

Вводные пояснения. В регулировании водообмена растений значительную роль играют водоудерживающие силы, обусловленные в основном содержанием в клетках осмотически активных веществ и способностью коллоидов к набуханию.

Водоудерживающая способность клеток зависит от условий выращивания растений. В частности, большое влияние оказывают условия питания. При оптимальных условиях водоудерживающая способность возрастает, водоотдача за 30 мин составляет 4...6% исходной величины. Определение водоудерживающей способности по Арланду основано на учете потери воды завядающими растениями.

Порядок работы. Берут пятнадцатидневные растения овса, выращенные на песке с внесением удобрений (опыт) и без удобрений (контроль). Осторожно извлекают из песка по 20 растений каждого варианта и отделяют надземную часть от корней. Затем часть стебля, которая находилась в песке, покрывают парафином, чтобы исключить ее участие в испарении воды. Для этого нижние этиолированные части стебля опускают в расплавленный парафин, подкрашенный суданом III, с температурой не выше 50 °С.

Взвешивают все растения вместе на технических весах, аккуратно расставляют их в штативы. Взвешивания повторяют через 30 мин, 1 ч, 1 ч 30 мин и 2 ч. Убыль в массе показывает абсолютное количество воды, которое теряют испытуемые растения за 30 мин.

Для установления испаряющей массы взвешивают отчлененные парафинированные участки и вычитают из исходной массы растений.

Используя полученные данные, вычисляют количество испарившейся воды в процентах испаряющей массы за последовательные интервалы в 30 мин. Изображают графически динамику водоотдачи, делают заключение о водоудерживающей способности растений, выращенных при разных условиях питания.

Результаты записывают по форме (табл. 20).

Материалы и оборудование. Пятнадцатидневные растения овса или пшеницы, парафин, подкрашенный суданом III.

Штативы, технические веса, ножницы, водяная баня.

20. Определение водоудерживающей способности растений

Вариант	Число растений	Масса растений, г					Масса парафиниро- ванных участков, г	Количество испарившейся воды за каж- дые 30 мин, г				Испаряю- щая масса, г				Потеря воды за 30 мин, г			
		первоначальная	через 30 мин	через 1 ч	через 1 ч 30 мин	через 2 ч		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

Работа 34. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТИВНОСТИ ТРАНСПИРАЦИИ И ТРАНСПИРАЦИОННОГО КОЭФФИЦИЕНТА

Вводные пояснения. Для полной характеристики водно-го обмена растений необходимо знать показатели эффективности расходования воды: продуктивность транспирации, т. е. количество сухого вещества (г), образовавшееся при испарении 1 кг (1 л) воды, и обратную величину — транспирационный коэффициент.

При образовании 1 г сухого вещества расходуется в среднем 300...500 г воды. Более низкие значения транспирационного коэффициента у просовидных злаков, более высокие — у льна и многолетних трав. Значительное влияние на эффективность использования воды оказывают условия выращивания растений: чем лучше условия минерального питания и влагообеспечения растений, тем выше урожай и меньше расход воды на создание единицы массы.

Показатели продуктивности использования воды обычно определяют за вегетационный период. Однако следует иметь в виду, что в течение онтогенеза они меняются. Так, у яровой пшеницы в период всходов транспирационный коэффициент наибольший, затем снижается и достигает минимума в конце кушения, вновь возрастает во время выхода в трубку, достигая максимума в фазах колошения и цветения, после чего снижается.

Цель работы — определить показатели эффективности расходования воды пшеницей в фазах кушения и колошения.

Порядок работы. Для работы в песчаной культуре на 0,5 нормы питательной смеси Хогланда — Снайдер-

са выращивают трех- и пятинедельные растения яровой пшеницы. Подбирают по шесть сосудов с выравненными растениями каждого срока посева.

Из трех сосудов каждого варианта аккуратно извлекают растения, отмывают корни от песка, просушивают фильтровальной бумагой и определяют начальную массу воздушно-сухого материала в каждом сосуде отдельно. Для этого растения измельчают и в открытых корбочках из кальки помещают в сушильный шкаф, предварительно нагретый до 105°C; при этой температуре происходит полная инаktivация всех ферментов, что предотвращает последующие изменения сухой массы. Затем материал высушивают на воздухе или в сушильном шкафу при 60°C и взвешивают на технических весах с точностью до второго знака,

Оставшиеся три сосуда каждого варианта нумеруют, поливают через дренажную трубку до постоянной массы (влажность 60 % наибольшей влагоемкости — НВ) и в течение недели учитывают количество израсходованной растениями воды.

Правильный учет возможен только при исключении испарения влаги корнесобитаемой средой. Для этого поверхность песка заливают расплавленным (не горячим!) парафином, который, затвердев, дает непроницаемый для воды слой. Можно заменить парафин слоем негигроскопичной ваты или мульчировать поверхность негигроскопичным гранулированным пенопластом. Через неделю определяют воздушно-сухую массу растений каждого сосуда, работу выполняют в той же последовательности, что и при первом наблюдении.

21. Определение показателей эффективности расходования воды

Возраст растения	Фаза развития	Начальная воздушно- сухая масса, г				Израсхо- довано воды за неделю, г				Накoppлено воздушно- сухой массы, г				Транспирационный коэффициент	Продуктивность транспирации, г/д
		1	2	3	среднее	1	2	3	среднее	1	2	3	среднее		

3...4 неде- Кущение
ли
5...6 не- Колошение
дель

На основании данных о количестве израсходованной растениями каждого сосуда воды и накопленного сухого вещества за этот период вычисляют продуктивность транспирации и транспирационный коэффициент. Сопоставляют результаты определений по вариантам. Результаты опыта записывают по форме (табл. 21).

Материалы и оборудование. Трех- и пятинедельные растения пшеницы, выращенные в литровых сосудах в песчаной культуре.

Технические весы, весы марки РН-10Ц-13У, сушильный шкаф, кристаллизаторы, калька, фильтровальная бумага, стеклянные стаканчики.

Работа 35. ВЛИЯНИЕ ВЛАЖНОСТИ КОРНЕОБИТАЕМОЙ СРЕДЫ НА ВОДООБМЕН И РОСТ РАСТЕНИЙ

Вводные пояснения. Недостаток или избыток влаги в корнеобитаемой зоне влияет на поглотительную активность корневой системы, изменяет оводненность тканей, что приводит, в свою очередь, к нарушению общего характера обмена веществ в растении.

Оптимальная влажность почвы для сельскохозяйственных растений средней полосы — 70...80 % НВ. Уменьшение влажности почвы приводит к непропорционально большому снижению урожая. Это связано с тем, что с понижением влажности передвижение воды в почве значительно затрудняется и эффективность использования влаги растением снижается.

При засухе первыми прекращают рост надземные органы. Это приводит к нарушению оптимального соотношения между надземной и корневой системами и отражается на формировании урожая.

Порядок работы. Опытные растения выращивают в песчаной культуре на 0,5 нормы питательной смеси Хогланда — Снайдерса. Варианты опыта: влажность 60 % и 40 % НВ песка. Определение проводят в трехкратной повторности.

В опыте используют чистый, высушенный кварцевый песок, просеянный через сито с отверстиями диаметром 0,5...0,6 мм. Наибольшую влагоемкость песка определяют в специальных цилиндрах диаметром 4...5 см, высотой 15...18 см, обвязанных с одного конца марлей. На сетчатое дно кладут двойной кружок влажной фильтровальной бумаги, взвешивают цилиндр на технических весах с точностью до 0,01 г. Цилиндр

заполняют на $\frac{3}{4}$ воздушно-сухим песком, слегка уплотняя постукиванием по стенке, и вновь взвешивают на технических весах. Затем цилиндр ставят в кристаллизатор, на дно которого налита вода. Для уменьшения испарения воды всю установку закрывают стеклянным колпаком. После того как вода поднимется до поверхности песка, что заметно по изменению его цвета, цилиндр вынимают из воды, дают стечь лишней воде, обсушивают снаружи фильтровальной бумагой и взвешивают. Затем вновь помещают на 1...2 ч в кристаллизатор с водой и взвешивают. Описанную операцию повторяют до тех пор, пока масса цилиндра с песком, насыщенным водой, не станет постоянной.

Определение выполняют в двухкратной повторности. Наибольшую влагоемкость песка рассчитывают по формуле

$$НВ = \frac{c-b}{b-a} \cdot 100\%,$$

где a — масса цилиндра, г; b — масса цилиндра с воздушно-сухим песком, г; c — масса цилиндра с песком, насыщенным влагой, г.

Растения выращивают в литровых стеклянных банках (вегетационных сосудах). Песок в сосудах и корневая система должны быть защищены от света, поэтому на сосуды надевают чехлы из плотной бумаги. Сосуды тарируют до одинаковой массы. Для этого помещают в банку стеклянную трубочку диаметром 1,5 см и высотой 18 см, которая будет служить для полива, круг из марли диаметром 15 см и добавляют дренаж (битое стекло или гравий) до общей массы 650 г.

Масса воздушно-сухого песка в сосуде — 1,3 кг. Массу, до которой надо поливать сосуды, рассчитывают следующим образом.

Допустим, полная влагоемкость песка составляет 25 %, поливать предполагается до влажности 60 % НВ, тогда влажность песка, до которой нужно поливать, — 15 %. Масса песка на один сосуд — 1,3 кг, масса воды — 0,195 кг ($1,3 \text{ кг} \cdot 15\%$). Сосуд следует поливать до массы 2,15 кг ($0,65 + 1,3 + 0,195 = 2,145 \text{ кг}$). По этой же схеме рассчитывают массу, до которой необходимо поливать сосуды в варианте с влажностью 40 % (табл. 22).

Пользуясь таблицей (см. работу 59), находят количество растворов питательных солей, которое необходимо внести в каждый сосуд. Общий объем раствора —

22. Расчет поливной массы сосуда

Влажность, %	Масса сосуда, кг	Масса песка, кг	Наибольшая поглощаемость песка, %	Масса воды, кг	Общая масса сосуда с песком при поливе, кг
60	0,65	1,3			
40	0,65	1,3			

35 мл. В лоток высыпают 1,3 кг песка, увлажняют его 120 мл воды. Затем вносят поочередно растворы солей и тщательно перемешивают их с песком.

У одной из стенок сосуда делают горку из гравия. Нельзя раскладывать дренаж по всему дну сосуда, так как в этом случае вода не будет подниматься вверх по капиллярам песка. Трубку для полива продевают в отверстие марлевого круга и устанавливают в дренажной горке так, чтобы она находилась в 2 см от края сосуда. Марля должна покрывать дренажную горку.

Затем песок, смешанный с питательным раствором, насыпают в сосуд слоем 3...4 см и сильно уплотняют. Прибавляют еще песок, уплотняя его тыльной стороной руки, и так постепенно набивают сосуд. Уровень песка должен быть на 1,5...2 см ниже верхнего края сосуда. Если песок будет недостаточно и неравномерно уплотнен, то при поливе он осядет и повредит корни. Посев выполняют отобранными наклюнувшимися семенами. Для этого в песке стеклянной палочкой делают в каждом сосуде по десять лунок, высевая в них семена пшеницы, заравнивают лунки и поливают сверху, расходуя 40 мл воды на сосуд.

На сосуд наклеивают этикетку с указанием факультета, номера группы и фамилии экспериментатора, даты закладки и варианта опыта, поливной массы сосуда. До появления всходов сосуда накрывают бумагой для предохранения от подсыхания поверхности песка. Поливают, опрыскивая небольшими порциями воды.

Как только появятся всходы, бумагу с сосудов снимают и переходят на полив по массе. Поливают сосуды попеременно: четыре-пять раз подряд через трубку, затем один-два раза сверху, чтобы питательные соли не скапливались в верхней или нижней части сосуда. Поливать одновременно сверху и снизу, как это иногда рекомендуют, не следует, потому что при этом в середине сосуда «запирается» воздух и увлажнение данного

слоя затрудняется. Несколько дней после появления всходов растения поливают во всех сосудах равным количеством воды до влажности 60 % НВ.

Через неделю после появления всходы прореживают, оставляя в сосуде по четыре одинаковых растения, и переводят на разные режимы увлажнения корнеобитаемой среды (полив по массе до 60 и 40 % НВ).

Через три недели осуществляют учет показателей водообмена и роста растений с использованием следующих методов: водного потенциала листьев — методом Шардакова, интенсивности транспирации — весовым методом или транспиометром конструкции А. П. Ваганова, водоудерживающей способности — методом Арланда, подсчета количества устьиц в поле зрения микроскопа, биометрическими измерениями надземной части и корневой системы.

Делают вывод о влиянии влажности корнеобитаемой среды на водообмен и рост растений. Результаты опыта записывают по форме (табл. 23).

23. Влияние влажности почвы на водообмен и рост растений

Влажность, %	Водный потенциал листьев, кПа	Интенсивность транспирации, мг/(г·ч)	Число устьиц в поле зрения микроскопа	Водоотдача за 30 мин, %	Высота растений, см	Число листьев	Объем корней, см ³	Сырая масса, г на один сосуд		Отношение массы надземной части к массе корней	Внешний вид растений
								надземная часть	корневая система		

60

40

Материалы и оборудование. Семена пшеницы карликового сорта Канада, растворы солей для питательной смеси Хогланда.

Литровые стеклянные банки, стеклянные трубки для полива, дренаж, марля, чехлы для сосудов и шпатель, песок, цилиндры для определения наибольшей влагоемкости песка, кристаллизаторы, стеклянные колпаки, технические весы, линейки, весы марки РН-10Ц-13У, оборудование для определения показателей водного режима.

Глава 4

ФОТОСИНТЕЗ

Фотосинтез — процесс усвоения растениями световой энергии и использования ее для образования органических веществ из диоксида углерода и воды. В ходе этого

процесса в атмосферу выделяется кислород. Фотосинтез осуществляется при участии многих ферментов и кофакторов. Условно в нем выделяют две стадии: световую, или фотохимическую, и темновую, или химическую. Первая включает реакции поглощения хлорофиллом и другими пигментами квантов света и последующую трансформацию световой энергии в химическую энергию связей аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ·Н). В темновой стадии запасенная в форме АТФ и НАДФ·Н химическая энергия используется для восстановления акцентированного диоксида углерода до углеводов и других продуктов.

У высших растений фотосинтез протекает в специальных клеточных органеллах листьев (и других зеленых частей) — хлоропластах, число которых в клетках варьирует в зависимости от вида растения и ткани. В одной клетке листа в среднем присутствует 20...30 хлоропластов.

Хлоропласты разных растений могут значительно отличаться по форме, но обычно имеют вид округлых или дискообразных телец диаметром около 5 мкм, толщиной 2...3 мкм. Снаружи хлоропласты окружены оболочкой, состоящей из двух мембран — наружной и внутренней. Каждая мембрана образована двумя слоями белков, разделенных бимолекулярным слоем липидов. Внутренняя мембрана ограничивает бесцветную строму, в которой располагается много уложенных мембранных мешочков — тилакоидов, собранных в стопки, называемые гранами. Количество гран может составлять 40...50 и более. Число тилакоидов в гране колеблется от пяти-шести до нескольких десятков. Отдельные тилакоиды соседних гран соединены между собой ламеллами — мембранами стромы.

Согласно современным представлениям, в тилакоидных мембранах локализованы все фотосинтетические пигменты хлоропласта и ферменты, необходимые для осуществления световых реакций фотосинтеза. В строме содержатся ферменты, участвующие в темновых превращениях диоксида углерода. Таким образом, сложная и тонкая структура хлоропласта обеспечивает пространственное разделение отдельных реакций а тем самым и эффективный ход фотосинтеза в целом. Образующиеся в пластидах продукты ассимиляции транспор-

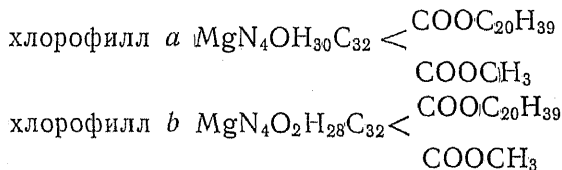
тируются в другие органы и ткани растения, где используются в процессе метаболизма и роста.

Таким образом, вся совокупность жизненных проявлений организма тесно связана с фотосинтезом. Более того, синтезированные зелеными растениями органические вещества служат пищей для всех остальных организмов, в том числе и человека, а кислород, выделяемый в процессе фотосинтеза, обеспечивает существование высших организмов. Ежегодная первичная продуктивность фотосинтеза на планете составляет более 100 млрд т сухой массы, в которой аккумулируется примерно $17 \cdot 10^{21}$ Дж солнечной энергии. Следовательно, фотосинтез — один из важнейших движущих факторов круговорота веществ и энергии на Земле.

Работа 36. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПИГМЕНТОВ ЛИСТА

Вводные пояснения. Пигментная система хлоропласта представлена двумя типами пигментов: зелеными — хлорофиллами *a* и *b* и желтыми — каротиноидами. Основной функциональный пигмент — хлорофилл *a*, обнаруженный, за исключением бактерий, у всех фотосинтезирующих организмов. Этот пигмент служит непосредственным донором энергии для фотосинтетических реакций, остальные пигменты лишь передают поглощенную ими энергию хлорофиллу *a*. У большинства наземных высших растений содержание хлорофилла *a* в два-три с половиной раза выше, чем содержание хлорофилла *b*.

По химической природе хлорофиллы *a* и *b* — сложные эфиры дикарбоновой кислоты хлорофиллина и двух спиртов — метилового и одноатомного непредельного спирта фитола. Поэтому по химической номенклатуре их можно определить как фитилметилхлорофиллиды:



Структурной основой молекулы хлорофилла служит порфириновое ядро, образованное четырьмя пиррольными кольцами, связанными друг с другом метиновыми

мостиками. В центре ядра находится атом магния, удерживаемый в этом положении за счет связей с атомами азота. Четыре атома азота придают ядру гидрофильный характер. Существенная структурная особенность хлорофилла — наличие в его молекуле изоциклической группировки — циклопентана. Следовательно, асимметричная молекула хлорофилла включает гидрофильную «головку» и липофильный «хвост», представленный длинной цепью фитола.

Подобного рода поляризация гидрофильных и гидрофобных частей важна для пространственного фиксирования молекулы хлорофилла в ламеллах гран. Циклическая система конъюгированных двойных связей порфирина и атом магния определяют фотохимическую активность пигмента. Хлорофилл *b* отличается от хлорофилла *a* лишь замещением у третьего углеродного атома во втором пиррольном кольце его молекулы метильной группы на альдегидную.

Каротиноиды — это сопряженные полиеновые соединения с 40 атомами углерода в цепи, которые можно рассматривать как производные пятиуглеродного соединения изопрена. Каротиноиды подразделяют на каротины и ксантофиллы. Каротины — непредельные углеводороды с эмпирической формулой $C_{40}H_{56}$. По химической структуре они могут быть ациклическими, моноциклическими и бициклическими соединениями. В циклических каротинах шестичленные кольца представлены двумя типами: β -иононовыми и α -иононовыми.

В фотосинтезирующих организмах группа желтых пигментов представлена ликопином, α -каротином, β -каротином и γ -каротином. У высших растений преобладает β -каротин. Его молекула образована двумя симметрично расположенными иононовыми кольцами, соединенными длинной углеродной цепью с системой регулярно чередующихся двойных связей.

Ксантофиллы — кислородсодержащие производные каротинов — у растений представлены лютеином ($C_{40}H_{56}O_2$), зеаксантином ($C_{40}H_{56}O_2$), виолаксантином ($C_{40}H_{56}O_4$) и неоксантином ($C_{40}H_{56}O_4$). Однако преобладает лютеин, по химической структуре близкий к α -каротину, но в отличие от последнего представляющий собой двуатомный спирт, т. е. в каждом иононовом кольце его один атом водорода замещен на гидроксильную группу. Благодаря присутствию гидроксильных и дру-

гих кислородсодержащих групп ксантофиллы легко растворяются в спирте и несколько хуже (в отличие от каротинов), — в неполярных растворителях. Хроматофорную систему каротиноидов составляют конъюгированные двойные связи.

Порядок работы. Получение спиртового раствора (вытяжки) пигментов. Обычно пигменты из растительной ткани извлекают полярными растворителями (этиловый спирт, ацетон), которые разрушают связь хлорофиллов и ксантофиллов с липопротеидами пластид и тем самым обеспечивают их полное экстрагирование. Неполярные растворители (петролейный эфир, гексан, бензин и др.) не нарушают связи этих пигментов с белками и потому не могут их извлечь из свежих листьев. Для получения вытяжки пигментов используют как сырой, так и сухой материал. В последнем случае высушенные листья предварительно обрабатывают горячей водой, чтобы облегчить последующее извлечение пигментов.

Сухие листья крапивы помещают в коническую колбу на 200 мл и ошпаривают кипятком, затем воду сливают. В колбу приливают 100 мл этилового спирта, закрывают ее корковой пробкой с обратным холодильником и ставят в баню с кипящей водой для экстрагирования пигментов. После пятиминутного кипячения содержимое колбы охлаждают и раствор осторожно сливают в другую колбу. Экстракт используют в последующих опытах.

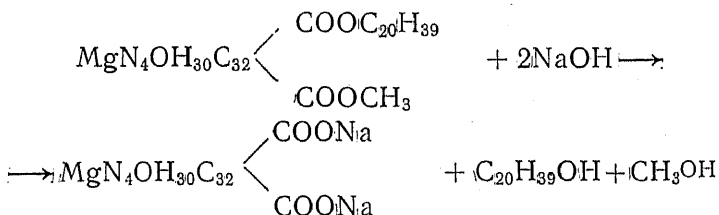
Разделение пигментов по Краусу. Метод основан на различной растворимости пигментов в спирте и бензине. Указанные растворители в одном сосуде не смешиваются, а образуют две фазы — верхнюю бензиновую и нижнюю спиртовую, благодаря чему разделяются компоненты смеси пигментов.

В пробирку наливают 2...3 мл спиртового экстракта пигментов, добавляют 3...4 мл бензина. Содержимое пробирки сильно встряхивают, предварительно закрыв ее пробкой или большим пальцем, и оставляют отстояться. По мере расслоения эмульсии бензиновый слой будет окрашиваться в зеленый цвет из-за лучшей растворимости в нем хлорофиллов. В бензин переходит и каротин, но его окраска маскируется окраской хлорофилла. Ксантофилл остается в спиртовом слое и придает ему золотисто-желтую окраску.

Если пигменты разделяются недостаточно четко, добавляют три-четыре капли воды и снова встряхивают. При избытке воды возможно помутнение нижнего слоя. В этом случае следует прилить немного этилового спирта и взболтать содержимое пробирки.

Зарисовывают картину распределения пигментов и делают выводы.

Омыление хлорофилла щелочью. Обработка хлорофилл щелочью, можно вызвать омыление эфирных групп, т. е. отщепление остатков метилового спирта и фитола:

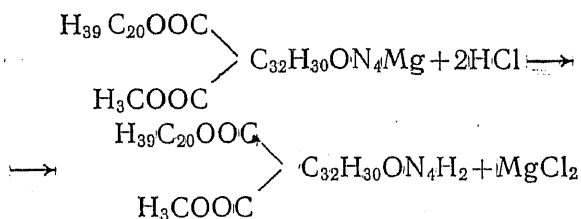


Образующаяся при этом соль хлорофиллиновой кислоты сохраняет зеленую окраску и оптические свойства хлорофилла, но отличается от него большей гидрофильностью.

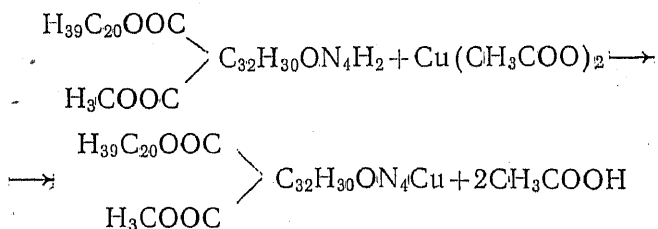
В пробирку с 2...3 мл спиртового раствора пигментов приливают 1 мл 20 %-го раствора NaOH и взбалтывают. После смешивания экстракта со щелочью пробирку ставят в кипящую водяную баню. Как только раствор закипит, пробирку вынимают и охлаждают. К охлажденному раствору добавляют равный объем бензина и несколько капель воды для лучшего разделения смеси. Затем содержимое пробирки резко встряхивают и дают отстояться.

В бензиновый слой переходят каротин и ксантофилл, а в спиртовой — натриевая соль хлорофиллиновой кислоты. Зарисовывают окраску слоев, указывая распределение пигментов.

Получение феофитина и обратное замещение водорода атомом металла. Атом магния сравнительно слабо удерживается в порфириновом ядре хлорофилла и при осторожном воздействии сильных кислот легко замещается двумя протонами с образованием феофитина бурого цвета:



Если на феофитин действовать солями меди, цинка или ртути, то вместо двух протонов в ядро входит соответствующий металл и продукты реакции окрашиваются в зеленый цвет. Однако полученная окраска несколько отличается от окраски хлорофилла:



Следовательно, цвет хлорофиллов обусловлен металлорганической связью в их молекулах. Обратное введение магния в феофитин происходит с большим трудом. В две пробирки берут по 2...3 мл спиртовой вытяжки пигментов и добавляют по одной-две капли 10 %-го раствора соляной кислоты. При взбалтывании зеленая окраска хлорофилла переходит в бурую, характерную для феофитина. Одну пробирку с феофитином оставляют для контроля, а во вторую вносят несколько кристаллов ацетата меди и нагревают раствор на водяной бане до кипения. По мере нагревания бурый цвет раствора меняется на зеленый в результате образования хлорофиллоподобного производного меди.

Зарисовывают окраску феофитина и медьпроизводного хлорофилла.

Материалы и оборудование. Сухие листья, этиловый спирт, бензин, 20 %-й раствор NaOH, 10 %-й раствор соляной кислоты в капельнице, ацетат меди.

Конические колбы с обратным холодильником, водяные бани, штативы с пробирками, пипетки на 1 мл, конические колбочки, цветные карандаши.

Работа 37. НАБЛЮДЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПИГМЕНТОВ

Вводные пояснения. В процессе фотосинтеза световая энергия перед преобразованием в химическую должна быть поглощена пигментами. Пластидные пигменты поглощают свет видимой части спектра (380...720 нм), чем обусловлено название излучения этой области спектра (фотосинтетически активная радиация, или ФАР). Пигменты поглощают видимый свет не полностью, а избирательно, т. е. каждый пигмент имеет свой характерный спектр поглощения. В частности, важная особенность спектра поглощения хлорофилла *a* и *b* — наличие у них двух ярко выраженных максимумов: в красной области — соответственно 660 и 640 нм и в сине-фиолетовой — 430 и 450 нм. Минимум поглощения лежит в зоне зеленых лучей. Этим и объясняется зеленая окраска пигментов. В живом листе у хлорофиллов более широкий и выравненный спектр поглощения. Так, красный максимум поглощения хлорофилла *a* в хлоропласте имеет несколько пиков: 670, 683, 700, 710 нм; у хлорофилла *b* он приходится на длины волн 650...655 нм. Аналогичное смещение в сторону длинноволновой части характерно и для синего максимума. Указанные различия между спектрами поглощения хлорофиллов в растворе и листе обусловлены степенью агрегации молекул пигмента и характером их связи с липопротеиновым комплексом в ламеллах тилакоидов.

Каротины и ксантофиллы поглощают свет только сине-фиолетовой части спектра. Оптические свойства пигментов определяются особенностями их химической структуры. В молекулах хлорофиллов и каротиноидов существует система конъюгированных (сопряженных) двойных связей. Скелет системы составляют атомы углерода, соединенные между собой простыми (двухэлектронными) ковалентными связями — σ -электронами. В образовании двойных связей, помимо σ -электронов, участвуют два π -электрона. В подобных системах π -электроны не связаны с определенными атомами углерода, поэтому могут перемещаться по всей молекуле, образуя делокализованное электронное облако. Возбуждение π -электронов может осуществляться за счет квантов видимого света.

В молекулах хлорофилла и каротиноидов система

конъюгированных двойных связей определяет поглощение сине-фиолетовых лучей. Для хроматофорных свойств хлорофиллов большое значение имеет также гидрирование связи между атомами углерода в положении седьмого и восьмого атомов углерода четвертого пиррольного кольца. В частности, оно приводит к появлению полосы поглощения в красной части спектра и ослабляет поглощение желто-зеленых лучей. И, наконец, присутствие магния в ядре обуславливает еще большее усиление поглощения в красной области и ослабление — в зеленой.

Для установления спектра поглощения пигментов используют спектроскоп. В него одновременно поступают два световых потока. Один идет непосредственно от источника света и проходит через кювету с пигментом, а потом разлагается призмой на составные части, другой отражается зеркалом в боковую щель, где попадает на грань второй призмы. В результате возникают два параллельных спектра, расположенных один над другим. Спектр отраженного от зеркала света служит контролем. По положению темных полос в опытном спектре определяют, какие лучи поглощаются исследуемым пигментом.

Порядок работы. Определение спектра поглощения хлорофилла. Спектроскоп устанавливают по отношению к свету так, чтобы все области спектра имели одинаковую яркость. В кювету наливают спиртовую вытяжку хлорофилла, помещают ее перед щелью спектроскопа и определяют положение темных полос, которые соответствуют лучам, поглощаемым хлорофиллом.

Ширина полос зависит от концентрации пигмента или толщины слоя его раствора. Для наблюдения спектров поглощения растворов с разной концентрацией хлорофилла разбавляют вытяжку спиртом в отношениях 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 и т. д. и исследуют оптические свойства полученных растворов. По окончании опыта делают заключение о зависимости спектра поглощения хлорофилла от концентрации его раствора и объясняют установленный факт.

Спектры поглощения каротина и ксантофилла. Для получения спектра поглощения каротиноидов пипеткой осторожно берут бензиновый раствор, в который перешли каротин и ксантофилл после

омыления хлорофилла, переносят его в кювету и помещают перед щелью спектроскопа. Рассматривают спектр поглощения и сравнивают его со спектром поглощения хлорофилла. Зарисовывают оба спектра.

Флуоресценция хлорофилла. Флуоресценция — испускание света возбужденной молекулой хлорофилла. Суть явления в следующем. При комнатной температуре и в темноте молекула хлорофилла находится в основном состоянии, т. е. энергия ее соответствует нижнему синглетному уровню (S_0). Поглощение кванта света сопровождается переходом одного из π -электронов на более высокий энергетический уровень. В результате возникает синглетное электронно-возбужденное состояние молекулы.

Синглетным называют такое возбужденное состояние, при котором переход электрона на более высокий энергетический уровень не сопровождается изменением знака спина. В спектрах поглощения ему соответствует одна линия. Если при этом поглощается квант красного света, то электрон переходит на первый синглетный уровень (S_1) с энергией 1,7 эВ и временем жизни $10^{-8} \dots 10^{-9}$ с. В случае захвата кванта синего света электрон оказывается на втором синглетном уровне (S_2) с энергией 2,9 эВ, а время жизни электрона в таком состоянии уменьшается до $10^{-12} \dots 10^{-13}$ с.

Независимо от того, в какое электронно-возбужденное состояние молекула была переведена поглощенным квантом, она в конечном счете переходит на низший колебательный подуровень первого синглетного возбужденного состояния (S_1). Энергия этого состояния может использоваться на осуществление фотохимических процессов, мигрировать от одной молекулы хлорофилла к другой, растрачиваться в виде тепла или флуоресцентного излучения. В последнем случае электрон возвращается в исходное положение.

Таким образом, независимо от длины возбуждающего света хлорофилл флуоресцирует только в красной части спектра. Уменьшение энергии кванта, излученного возбужденной молекулой, по сравнению с энергией поглощенного кванта получило название стоксового сдвига.

Флуоресцируют только хлорофилл *a* и хлорофилл *b*; каротиноиды не обладают этой способностью. В живом листе основным флуоресцирующим пигментом слу-

жит хлорофилл *a*. При этом в листьях флуоресценция выражена гораздо слабее, чем в растворе, так как часть поглощенной энергии используется на сенсбилизацию фотохимических реакций. Поэтому возрастание интенсивности фотосинтеза, как правило, влечет за собой ослабление флуоресценции. Изучение флуоресценции дает ценные сведения не только об использовании энергии в фотохимических процессах, но и о характере взаимодействия молекул различных пигментов в ламеллах тилакоидов хлоропласта, миграции энергии в фотосистемах и пр.

Для определения флуоресценции спиртовую вытяжку пигментов или раствор хлорофилла в бензине, полученный при разделении пигментов по Краусу, помещают на темную бумагу у источника освещения и рассматривают в отраженном свете. Вытяжка хлорофилла будет темно-красного цвета.

Флуоресценцию можно наблюдать и в живом листе. Для этого берут водяной мох *Fontinalis* или элодею, помещают объект на предметный столик микроскопа и освещают сине-фиолетовыми лучами, под действием которых зеленые пластиды начинают светиться красным светом.

Материалы и оборудование. Спиртовая вытяжка пигментов листа, раствор каротина и ксантофилла (бензиновый слой, полученный после омыления хлорофилла). Пипетки на 1 мл, спектроскопы.

Работа 38. ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ХЛОРОФИЛЛА НА РЕАКЦИЮ ПЕРЕНОСА ВОДОРОДА ПО ГУРЕВИЧУ

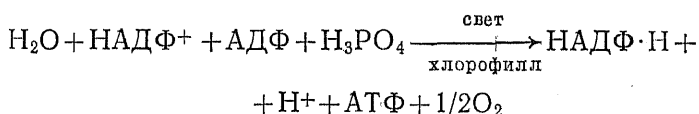
Вводные пояснения. Сущность световой стадии фотосинтеза заключается в окислении воды до молекулярного кислорода при помощи лучистой энергии, поглощенной хлорофиллом. Освобождающиеся при этом электроны передаются на НАДФ⁺, который восстанавливается до НАДФ·Н. По современным представлениям в переносе электронов воды на НАДФ⁺ участвуют последовательно две фотосистемы: фотосистема II и фотосистема I. Каждая фотосистема включает в себя светособирающие антенны, которые содержат различные формы хлорофилла *a*, отличающиеся максимумами поглощения в длинноволновой части спектра. Во вторую фотосистему входит также хлорофилл *b*. Кароти-

ноиды входят в состав той и другой фотосистемы. Наряду с антенными пигментами в фотосистемах I и II имеются реакционные центры, содержащие молекулы хлорофилла *a* с максимумами поглощения соответственно 700 (P_{700}) и 680 (P_{680}) нм и акцепторы электронов. Светособирающие антенны направляют энергию возбуждения к реакционным центрам.

Фотоокисление воды и выделение кислорода происходит в ходе реакций, протекающих в фотосистеме II, тогда как НАДФ⁺ восстанавливается в фотосистеме I. Фотосистемы связаны друг с другом последовательностью переносчиков электронов, образующих между ними «мост», идущий как бы «под гору». В результате электроны от воды проделывают Z-образный путь. Под влиянием индуцированного светом потока электронов возникает трансмембранный протонный градиент, вследствие которого с внутренней стороны тилакоидной мембраны среда становится более кислой, чем с наружной. Последующий возврат ионов H⁺ из тилакоида в строму через вмонтированную в мембране АТФ-азу приводит к образованию АТФ из АДФ и фосфата.

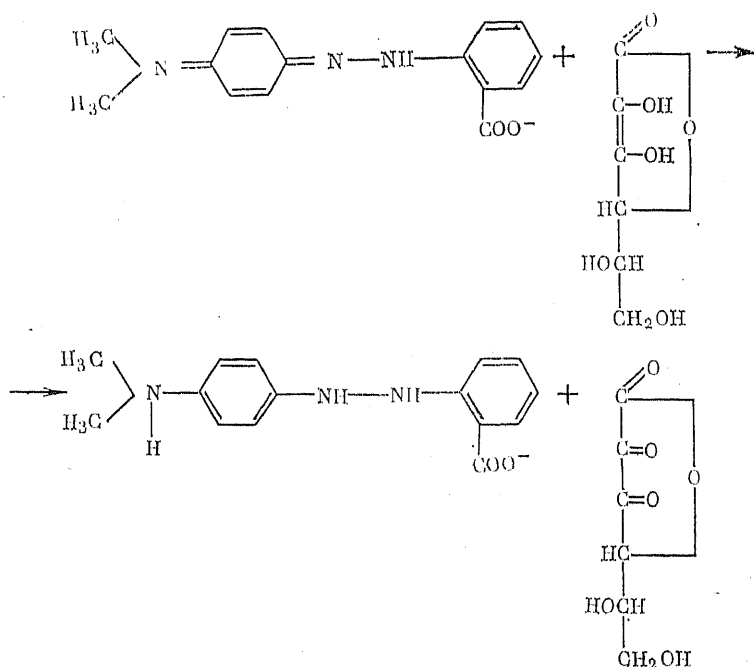
Итак, конечный результат фотоокисления воды — выделение молекулярного кислорода и образование богатых энергией и восстановительной силой соединений — АТФ и НАДФ·Н, необходимых для последующего восстановления диоксида углерода.

Схематично фотоллиз воды можно представить следующим образом:



Как видно из уравнения, хлорофилл выполняет здесь функцию фотосенсибилизатора, способствующего переносу электрона к НАДФ⁺.

Фотосенсибилизирующая роль хлорофилла может быть продемонстрирована на модельных реакциях с выделенным из растений пигментом. Для этого в качестве источника водорода берут аскорбиновую кислоту, а акцептора водорода — метиловый красный, который, присоединяя водород, восстанавливается до неокрашенного лейкосоединения. Аскорбиновая кислота окисляется в дегидроаскорбиновую кислоту:



Порядок работы. Берут четыре пробирки: в три наливают по 5 мл спиртовой вытяжки хлорофилла, четвертую — 5 мл этилового спирта. В первую, вторую и четвертую пробирки вносят по 50 мг кристаллической аскорбиновой кислоты и несколько раз встряхивают их. Во все пробирки с хлорофиллом добавляют по каплям отфильтрованный спиртовой раствор метиленового красного до тех пор, пока зеленая окраска не перейдет в красно-бурую. В четвертой пробирке окраску раствора при помощи индикатора доводят до ярко-розовой. Вторую пробирку закрывают чехлом из черной бумаги, затем все пробирки ставят в штатив и освещают электрической лампой (300 Вт), расположив ее на расстоянии примерно 15 см от штатива.

После десяти-пятнадцатиминутного освещения в первой пробирке в результате восстановления метиленовый красный обесцвечивается, и раствор вновь приобретает зеленую окраску. В опытных пробирках окраска раствора не меняется, так как без света, аскорбиновой кислоты или хлорофилла метиленовый красный не восстанавливается.

Результаты опыта записывают по форме (табл. 24).

24. Определение фотосенсибилизирующего действия хлорофилла

Вариант	Состав смеси в пробирках				Условия	Результат
	хлоро- филл, мл	этило- вый спирт, мл	кристалли- ческая асмор- биновая кислота, мг	насыщенный спиртовой раствор метиленового красного		
1	5	—	50	Добавляют до появле- ния красно-бурой окрас- ки	Свет	
2	5	—	50	То же	Темнота	
3	5	—	—	»	Свет	
4	—	5	50	»	»	

Материалы и оборудование. Метиленовый красный (насыщенный раствор в этиловом спирте), раствор хлорофилла (спиртовая вытяжка из листьев), аскорбиновая кислота (кристаллическая).

Градированные пипетки на 10 мл, пипетки на 1 мл, пробирки, штативы, электрические лампы на 300 Вт, плоские стеклянные сосуды с параллельными стенками.

Работа 39. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ

Вводные пояснения. Хлорофилл и каротиноиды — важнейшие компоненты фотосинтетического аппарата листьев. Количественное их содержание в листьях зависит от жизнедеятельности организма, его генетической природы. Поэтому оно может быть использовано как физиологический показатель, характеризующий онтогенетические, возрастные и генетические особенности растений. Количество пигментов отражает и реакцию растительного организма на условия произрастания. Поэтому при физиологических исследованиях часто возникает необходимость проследить за динамикой содержания хлорофилла и каротиноидов в отдельных органах.

Для извлечения пигментов из листьев применяют полярные растворители (этиловый спирт, ацетон) или смесь полярных и неполярных (петролейный эфир, гексан, бензин, бензол) растворителей. Выбор растворителя зависит от условий опыта и объекта исследования. Наиболее часто используют этиловый спирт и ацетон.

Пигменты лучше всего экстрагировать из свежего растительного материала, но можно и из фиксированного. В последнем случае надежным способом фикса-

ции служит замораживание тканей с последующей лиофилизацией (лиофильная сушка). Недопустимо фиксирование растительного материала сухим жаром в сушильном шкафу, поскольку постепенное повышение температуры сопровождается усилением гидролитических процессов, и в том числе гидролиза хлорофилла. Фиксированные листья помещают в эксикатор и хранят в темном и прохладном месте. При работе с сухим материалом берут 80 %-й раствор ацетона или 90 %-й этилового спирта.

Вытяжку используют для количественного анализа. Концентрацию пигментов определяют при помощи фотоэлектроколориметра или спектрофотометра. При этом надо различать учет пигментов в экстракте до разделения и после разделения на отдельные компоненты. Например, в спиртовой или ацетоновой вытяжке, содержащей все пигменты, можно определить концентрацию хлорофиллов, не отделяя их от каротиноидов, фотоэлектроколориметром. Это возможно, потому что для хлорофиллов в отличие от каротиноидов характерно поглощение и в красной части спектра.

Количество каротиноидов в смеси с хлорофиллами можно определить только на спектрофотометре. Для более тонкого количественного анализа пигментной системы листьев предварительно осуществляют ее разделение хроматографическим методом. Содержание пигментов выражают: в миллиграммах на единицу сырой или сухой массы (на 1 г), в процентах сырой (сухой) массы и на единицу площади листьев (дм²).

Порядок работы. Получение ацетоновой вытяжки. Навеску листьев определенного яруса (0,1...0,15 г) помещают в фарфоровую ступку, добавляют немного диоксида кальция, промытого кварцевого песка и растирают с 2...3 мл 85 %-го раствора ацетона. К растертой массе добавляют 4...5 мл ацетона и снова растирают несколько минут. После отстаивания раствора нижнюю сторону носика ступки слегка смазывают вазелином, экстракт осторожно сливают по палочке в воронку со стеклянным фильтром № 2 и отсасывают насосом.

Перед перенесением вытяжки воронку вставляют при помощи каучуковой пробки в колбу Бунзена (или градуированную вакуумную пробирку), соединенную с насосом. Экстракцию небольшими порциями чистого

растворителя повторяют до тех пор, пока пигменты не будут извлечены полностью. Затем фильтрат переливают через сухую стеклянную воронку в мерную колбочку на 25 мл. Колбу Бунзена дважды ополаскивают небольшой порцией ацетона, каждый раз сливая жидкость в мерную колбочку. Далее содержимое колбочки доводят растворителем до метки, закрывают каучуковой пробкой, тщательно взбалтывают и используют для определения концентрации пигментов.

Анализ пигментов выполняют при комнатной температуре на рассеянном свете, так как при сильном освещении может произойти фотоокисление хлорофилла. Хранят вытяжку в темном холодном месте.

Определение концентрации хлорофилла на фотоэлектроколориметре ФЭК-56М. Для установления концентрации окрашенных растворов на фотоэлектроколориметре измеряют разность силы электрических токов, возникающих между двумя фотоэлементами в результате неодинаковой интенсивности световых потоков, прошедших через растворитель и раствор. Общий вид фотоэлектроколориметра ФЭК-56М представлен на рисунке 14. Прибор снабжен набором кювет с различными расстояниями между рабочими гранями. Это дает возможность выбрать для раствора кювету такой рабочей длины, которая позволяла бы выполнять измерение на участке шкалы, дающем наиболее надежные результаты. Так, для хлорофилла этот интервал расположен между 0,1 и 0,4 делениями красной шкалы левого барабана.

Включают прибор в сеть и тумблер стабилизатора ставят в положение «Включ.». Прибору дают прогреться 30 мин. Затем при закрытой шторке 7 вращением отсчетных барабанов 2 совмещают риску с «0» делением шкалы, после чего при помощи рукоятки 4 устанавливают стрелку гальванометра 1 на «0». Далее открывают крышку прибора 8 и в левый кюветодержатель ставят кювету с растворителем (10 мм), а в правый—соответственно кюветы с растворителем и исследуемым раствором. В кюветодержателях все кюветы должны быть установлены на одинаковом расстоянии от входного отверстия и обращены к источнику света одной и той же гранью. Рабочие грани кювет следует протереть фильтровальной бумагой. Чтобы не загрязнить их, нельзя касаться этих граней ниже уровня жидкости.

Поместив кюветы и открыв шторку 7, вращением барабана 5 ставят красный фильтр (напротив световых потоков должны стоять кюветы с растворителем) и доводят стрелку гальванометра до деления «0» при помощи рукоятки 4. Затем поворотом барабана 10 в правом световом пучке заменяют кюветы с растворителем на кювету с исследуемым раствором. Вращением левого отсчетного барабана устанавливают стрелку гальванометра на «0» и записывают величину оптической плотности по красной шкале. Измерение выполняют не менее трех раз и, исходя из полученных данных, вычисляют среднее арифметическое значение оптической плотности.

Показания шкалы барабана переводят в величины концентрации, используя калибровочный график. Для

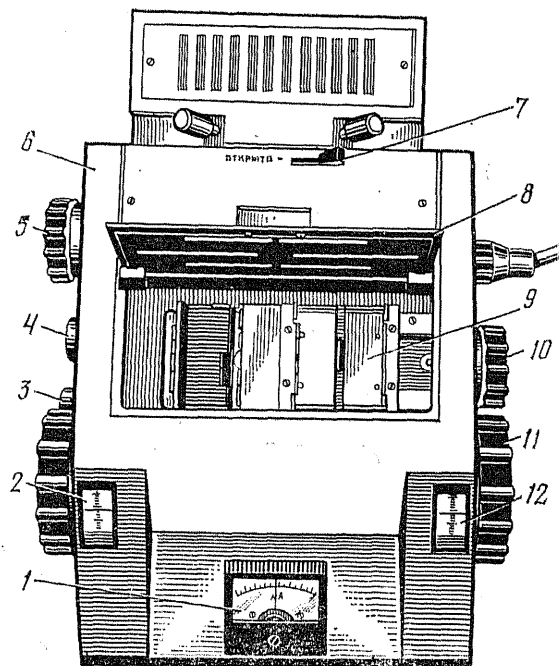


Рис. 14. Фотоэлектроколориметр ФЭК-56М:

1 — гальванометр; 2, 12 — окна отсчетных барабанов со шкалой; 3 — рукоятка чувствительности; 4 — рукоятка установки стрелки гальванометра на «0»; 5 — барабан переключателя светофильтров; 6 — корпус прибора; 7 — рукоятка шторки; 8 — крышка; 9 — кюветодержатели; 10 — барабан правого кюветодержателя; 11 — барабаны отсчета

этого готовят серию стандартных растворов хлорофилла возрастающей концентрации и находят оптическую плотность каждого из них. Затем строят график. На оси абсцисс откладывают значения концентрации, а на оси ординат — соответствующие им значения оптической плотности. Точки пересечения соединяют и получают калибровочный график.

Стандартные растворы готовят в мерных колбочках на 25 мл; концентрацию исходного раствора хлорофилла обычно определяют на спектрофотометре. В качестве стандартного можно использовать также раствор Гётри. Кюветы должны быть той же рабочей длины, что и при определении оптической плотности исследуемого раствора.

Чтобы вычислить концентрацию хлорофилла, на оси ординат находят установленную величину оптической плотности и от нее проводят горизонтальную прямую до пересечения с кривой графика. Из точки пересечения опускают перпендикуляр на абсциссу и определяют концентрацию хлорофилла. Ее выражают в процентах массы сырых листьев. Расчет ведут по формуле

$$X = \frac{100 \cdot B}{A},$$

где B — количество хлорофилла в вытяжке, мг; A — масса сырых листьев, взятых для анализа, мг; 100 — коэффициент для выражения в процентах.

Результаты определения записывают по форме:

Объект	Вариант опыта	Нарезка листьев, мг	Объем вытяжки, мл	Показания шкалы ба- рабана	Количество хлоро- филла по калибро- вочной кривой, мг на 25 мл	Содержание хлорофилла, % массы сы- рых листьев

Определение концентрации хлорофилла и каротиноидов на спектрофотометре СФ-26. Спектрофотометрический анализ — наиболее точный количественный метод определения содержания пигментов листа. Как и на фотоэлектроколориметре, концентрация пигментов на спектрофотометре определяется по оптической плотности. Однако в отличие от первого спектрофотометр позволяет выполнять анализ смесей веществ с близкими максимумами поглощения,

что достигается за счет использования монохроматора, вследствие чего удается установить содержание хлорофиллов и каротиноидов в вытяжке без предварительного разделения. Плотность экстракта на спектрофотометре измеряют при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения хлорофиллов a и b в красной области спектра и при длине волны абсорбционного максимума каротиноидов. При этом учитывают, что положение максимума поглощения несколько меняется в зависимости от используемого растворителя. Концентрацию пигментов рассчитывают по уравнениям:

для 100 %-го ацетона (по Хольму — Ветштейну):

$$C_{\text{хл.}a} = 9,784D_{662} - 0,990D_{644};$$

$$C_{\text{хл.}b} = 21,426D_{644} - 4,650D_{662};$$

$$C_{\text{хл.}a+\text{хл.}b} = 5,134D_{662} + 20,436D_{644};$$

$$C_{\text{кар}} = 4,695D_{440,5} - 0,268C_{\text{хл.}a+\text{хл.}b};$$

для 85 %-го раствора ацетона (по Реббелену):

$$C_{\text{хл.}a} = 10,3D_{663} - 0,918D_{644};$$

$$C_{\text{хл.}b} = 19,7D_{644} - 3,87D_{663};$$

$$C_{\text{хл.}a+\text{хл.}b} = 6,4D_{663} + 18,8D_{644};$$

$$C_{\text{кар}} = 4,75D_{452,5} - 0,226C_{\text{хл.}a+\text{хл.}b};$$

для 80 %-го раствора ацетона (по Вернону):

$$C_{\text{хл.}a} = 11,63D_{665} - 2,39D_{649};$$

$$C_{\text{хл.}b} = 20,11D_{649} - 5,18D_{665};$$

$$C_{\text{хл.}a+\text{хл.}b} = 6,45D_{665} + 17,72D_{649};$$

для 96 %-го раствора этанола:

$$C_{\text{хл.}a} = 13,70D_{665} - 5,76D_{649};$$

$$C_{\text{хл.}b} = 25,80D_{649} - 7,60D_{665};$$

$$C_{\text{хл.}a+\text{хл.}b} = 6,10D_{665} + 20,04D_{649} = 25,1D_{654};$$

для этилового эфира:

$$C_{\text{хл.}a} = 9,93D_{660} - 0,78D_{642,5};$$

$$C_{\text{хл.}b} = 17,6D_{642,5} - 2,81D_{660};$$

$$C_{\text{хл.}a+\text{хл.}b} = 7,12D_{660} + 16,8D_{642,5};$$

$$C = \frac{1000D_{480} - 0,52C_{\text{хл.}a} - 7,25C_{\text{хл.}b}}{226}$$

где $C_{\text{хл.}a}$, $C_{\text{хл.}b}$, $C_{\text{хл.}a+\text{хл.}b}$ и $C_{\text{кар}}$ — соответственно концентрации хлорофиллов a , b , их суммы и каротиноидов, мг/л; D — экспериментально полученные величины оптической плотности при соответствующих длинах волн.

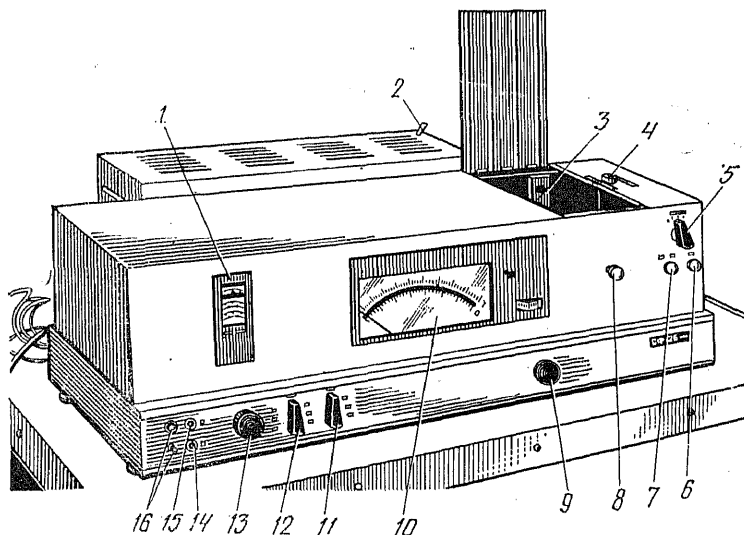


Рис. 15. Спектрофотометр СФ-26:

1 — шкала монохроматора; 2 — рукоятка переключения источника излучения; 3 — кюветное отделение; 4 — рукоятка переключения фотоэлементов; 5 — рукоятка установки чувствительности; 6 — рукоятка установки стрелки измерительного прибора на нуль; 7 — рукоятка шторки; 8 — рукоятка перемещения каретки с кюветами; 9 — рукоятка регулирования ширины щели; 10 — шкала измерительного прибора; 11 — рукоятка отсчета для выбора шкалы измерений (имеет четыре положения); 12 — рукоятка компенсации; 13 — рукоятка установки длин волн; 14 — сигнальная лампа включения лампы накаливания «Н»; 15 — сигнальная лампа включения дейтериевой лампы «Д»; 16 — тумблер включения прибора в сеть и сигнальная лампа «Сеть».

Общий вид спектрофотометра дан на рисунке 15. В приборе есть два источника сплошного спектра: дейтериевая лампа — для работы в интервале 186...350 нм (положение «Д») и лампа накаливания для работы в интервале 340...1100 нм (положение «Н»).

При определении оптической плотности хлорофиллов и каротиноидов в вытяжке переключатель ламп (фотоэлемент и источник излучения) устанавливают в рабочее положение. При определении оптической плотности хлорофиллов рукоятку переключателя фотоэлемента 4 переводят в положение «К». После этого закрывают фотоэлемент, поставив рукоятку шторки 7 в положение «ЗАКР.», а рукояткой регулировки ширины щели 9 устанавливают ширину щели примерно 0,1 мм.

Затем тумблером 16 включают прибор в сеть. Если загорятся сигнальные лампы «СЕТ.» и «Н», можно выполнять последующие операции, но предварительно прибор должен прогреться 30..60 мин.

После этого рукоятку компенсации 12 ставят на «0», рукоятку отсчета 11 в положение «1» и рукоятку чувствительности 5 в положение «1». Медленно вращая рукоятку 13, устанавливают нужную длину волны (для хлорофилла *a* — 663 нм, хлорофилла *b* — 644 нм). Затем помещают кюветы с растворителем и исследуемым раствором (10 мм) в кюветодержатель и закрывают кюветное отделение 3.

При закрытом фотоэлементе при помощи рукоятки установки нуля 6 добиваются нулевого положения стрелки измерительного прибора (по верхней шкале), после чего рукояткой 4 открывают фотоэлемент (при этом на пути светового потока должна стоять кювета с растворителем) и, регулируя ширину щели рукояткой 9, ставят стрелку на «0» нижней красной шкалы. Затем кювету с исследуемым раствором переводят в рабочее положение (рукоятка 8) и измеряют оптическую плотность (экстинкцию) по шкале Д. Результаты записывают по форме (табл. 25). Закрывают фотоэлемент и устанавливают длину волны для другого хлорофилла,

25. Схема записи результатов

Вариант	Навеска листьев, мг	Объем вытяжки, мл	Оптическая плотность		
			D_{663}	D_{644}	$D_{412,5}$

Продолжение

Вариант	Содержание пигментов в вытяжке, мг на 25 мл				Содержание пигментов, % массы сырых листьев			
	хлоро- филл <i>a</i>	хлоро- филл <i>b</i>	хлорофилл <i>a</i> +хлоро- филл <i>b</i>	каро- тино- иды	хлоро- филл <i>a</i>	хлоро- филл <i>b</i>	хлорофилл <i>a</i> +хлоро- филл <i>b</i>	каро- тино- иды

далее в той же последовательности определяют экстинкцию. При определении оптической плотности каротиноидов предварительно переводят рукоятку переключения фотоэлементов 4 в положение «Ф» и устанавливают длину волны 452,5 нм.

Концентрацию пигментов рассчитывают по Реббелену. Определив концентрацию пигмента, находят его содержание в опытном материале по той же формуле, что и в предыдущей работе.

Содержание хлорофилла в листьях растений составляет в среднем около 0,3 % сырой массы (0,1...0,7 %). При расчете на 1 дм² листовой поверхности количество хлорофилла варьирует в пределах 0,7...0,8 мг. Каротиноидов в листьях примерно в три — восемь раз меньше, чем хлорофилла.

Материалы и оборудование. Листья растений, 85 %-й раствор ацетона, кварцевый песок, СаСО₃, стандартный раствор Гётри, вазелин.

Весы, ножницы, ступки с пестиками, мерные колбы на 25 мл, воронки со стеклянным фильтром № 2, воронки, стеклянные палочки, фотоэлектроколориметр ФЭК-56М, спектрофотометр СФ-26, насос.

Приготовление раствора Гётри. В мерную колбу на 100 мл наливают 28,5 мл 1 %-го раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50 мл 2 %-го раствора $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ и 10 мл 2 н. раствора NH_4OH ; доливают дистиллированной водой до метки и тщательно взбалтывают. Окраска раствора Гётри соответствует окраске раствора, содержащего 85 мг/л хлорофилла.

Работа 40. РАЗДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ ЛИСТА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ ПО ЦВЕТУ

Вводные пояснения. При исследовании биологических соединений постоянно возникает необходимость их выделения и очистки. Наиболее удобный и тонкий метод разделения смеси — хроматографический. Принципы хроматографии разработаны русским физиологом М. С. Цветом в начале нашего века. Со времени начала использования хроматографии как аналитического метода исследования появилось множество ее модификаций, что значительно расширило область применения метода.

Все хроматографические системы состоят в основном из двух фаз: неподвижной (может быть твердой, жидкой или смесью твердой и жидкой) и подвижной (жид-

кой или газообразной). Обычно подвижная фаза перемещается по неподвижной или пропускается через нее. Хроматографическое разделение смеси веществ может идти при условии: адсорбционного равновесия между неподвижной твердой и подвижной жидкой фазами (адсорбционная хроматография); равновесного распределения между неподвижной жидкой и подвижной жидкой фазами (хроматография на бумаге); равномерного распределения между неподвижной жидкой и подвижной газовой фазами (газожидкостная хроматография); ионообменного равновесия между ионообменной смолой (неподвижная фаза) и электролитом (ионообменная хроматография); равновесного связывания макромолекулы с малой молекулой, по отношению к которой она проявляет сродство (аффинная хроматография).

Распределение соединения между двумя несмешивающимися фазами определяется коэффициентом распределения (отношение концентрации вещества в каждой из двух фаз).

В основе классического адсорбционного метода разделения пигментов по М. С. Цвету лежат различия в степени адсорбции данных веществ адсорбентом и растворимости их в соответствующих растворителях. Адсорбент — твердое вещество, способное удерживать на своей поверхности молекулы. Если смесь пигментов листа и растворителей пропустить через колонку с пористым материалом, то отдельные пигменты будут располагаться на разных уровнях колонки, давая своеобразный спектр распределения, соответствующий их адсорбционному сродству. Чем слабее сродство пигмента к адсорбенту, тем ниже пигмент будет концентрироваться. Последующим промыванием чистыми растворителями получают хроматограмму с четким разделением адсорбированных веществ на зоны.

При адсорбционном разделении пигментов в качестве адсорбента используют диоксид кальция, оксиды магния и алюминия, сахарозу, крахмал, целлюлозу.

Порядок работы. Экстрагирование пигментов из растительного материала. Помещают в фарфоровую ступку около 3 г свежих листьев, измельчают их, добавляют немного CaCO_3 для нейтрализации клеточного сока и растирают с промытым кварцевым песком. К растертой массе приливают 15 мл смеси бензина и бензола в соотношении 9:1 и 10 мл ацетона.

Снова растирают и перемешивают содержимое ступки до получения ярко-зеленого раствора.

По окончании экстрагирования смазывают снизу носик ступки вазелином и переносят вытяжку по палочке на стеклянный фильтр № 2, который предварительно вставляют в колбу для отсасывания, последнюю соединяют с насосом. Фильтруют при слабом отсасывании. Остатки растительного материала и ступку ополаскивают несколькими порциями ацетона, каждый раз сливая промывную жидкость на фильтр. Промывание ступки и осадка на фильтре считается законченным, когда промывная жидкость станет бесцветной.

Полученный после фильтрования экстракт пигментов переносят из приемника в делительную воронку и отмывают ацетон, который мешает адсорбционному анализу. Для этого в воронку осторожно вводят пипеткой 50 мл дистиллированной воды и жидкость слегка взбалтывают (при сильном взбалтывании возможно образование стойкой эмульсии).

После расслоения водно-ацетоновый слой сливают через кран воронки в приемник. Промывают пять-шесть раз. Если при добавлении воды на границе двух фаз появляются пенообразные хлопья хлорофилла, в раствор вводят кристаллическую поваренную соль. Под действием этой соли пигмент освобождается от воды и переходит в верхний бензин-бензоловый слой. Отмытый от ацетона раствор пигмента просушивают прокаленным сульфатом натрия. Для этого бензин-бензоловый экстракт переносят в сухую колбу, добавляют в нее 2...3 г безводного сульфата натрия и встряхивают содержимое. Обезвоженный экстракт пигментов используют для хроматографического анализа.

Приготовление адсорбционной колонки. Берут стеклянную трубку длиной 15 см, диаметром 1 см, нижний конец которой заужен. Перед набивкой колонки в него помещают ватную пробку, чтобы адсорбент не высыпался. Трубку постепенно заполняют тонко размолотым и хорошо просеянным диоксидом кальция. Уплотняют адсорбент стеклянной палочкой с расширенным концом, диаметр которого должен соответствовать диаметру трубки, или постукивая колонкой о твердую поверхность.

Заполняют колонку до тех пор, пока уровень диок-

Рис. 16. Установка для разделения пигментов:

1 — колба для отсасывания; 2 — пробка; 3 — стеклянная трубка; 4 — патрубок для вакуума

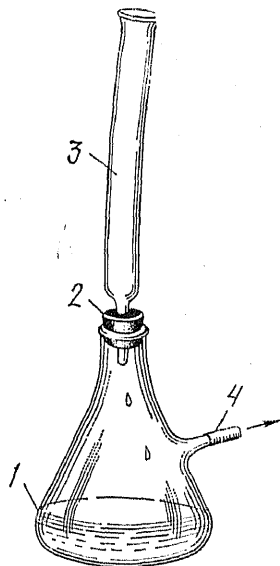
сида кальция в трубке не будет на 2...3 см ниже верхнего ее края.

Получение хроматограммы. Готовую к анализу колонку при помощи резиновой пробки вставляют в колбу для отсасывания (рис. 16). Затем в трубку наливают чистый бензин и слегка отсасывают насосом. Когда адсорбент будет смочен растворителем, переносят в колонку обезвоженный экстракт пигментов и дают раствору проникнуть в верхние слои адсорбента, а потом включают насос. После того как в нижней части трубки неокрашенным остается лишь небольшой слой диоксида кальция, отсасывание прекращают.

Таким образом получают первичную хроматограмму. Однако в ней еще не происходит полного разделения веществ смеси, поскольку зоны отдельных пигментов заходят одна в другую. Для полного разделения пигментов колонку промывают смесью бензина и бензола в соотношении 10:1. Под влиянием передвигающихся растворителей, конкурирующих с адсорбентом за связанные вещества, происходит четкое обособление окрашенных зон.

В конечном итоге пигменты располагаются следующим образом. Самая верхняя желто-зеленая зона — хлорофилл *b*, ниже сине-зеленая зона — хлорофилл *a* и, наконец, в самом низу ярко-желтая зона — ксантофилл. Каротин вместе с растворителями полностью отсасывается в колбу.

Зарисовывают полученную хроматограмму, в выводах объясняют наблюдаемое разделение пигментов. Разделенные таким образом пигменты могут быть отделены затем вместе с адсорбентом с колонки и элюированы органическими растворителями.



Материалы и оборудование. Бензин, бензол, уксус, сульфат натрия (свежепрокаленный), поваренная соль, кварцевый песок, листья растений, диоксид кальция.

Стеклянные трубки для разделения пигментов листа, колбы для отсасывания, насосы, конические колбы, воронки обычные и делительные, фарфоровые ступки с пестиками, стеклянные фильтры № 2, пипетки на 25 мл, мерные цилиндры на 25 мл, мензурки на 10 мл.

Работа 41. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ МЕТОДОМ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Вводные пояснения. Метод основан на распределении пигментов между целлюлозой хроматографической бумаги и подвижной фазой — растворителями. Когда по бумаге под действием капиллярных сил движутся растворители, молекулы пигментов, нанесенные на бумагу, распределяются между двумя фазами в соответствии с коэффициентом распределения. Чем выше растворимость пигмента в подвижной фазе, тем дальше он продвигается по бумаге вместе с растворителем, и наоборот.

Расстояние, пройденное нанесенным на бумагу пигментом в направлении движения растворителя, характеризуется величиной R_f , которая представляет собой отношение расстояния, пройденного растворенным пигментом, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя. В стандартных условиях эта величина для данного пигмента постоянна и соответствует его коэффициенту распределения.

Хроматографирование на бумаге выполняют восходящим и нисходящим способами. При восходящей хроматографии бумажную полосу подвешивают вертикально; при этом нижний ее конец, на который нанесена смесь пигментов, погружают в растворитель. По мере движения растворителя под действием капиллярных сил вертикально вверх происходит разделение растворенных веществ.

При нисходящей хроматографии верхний конец бумажной полосы со смесью пигментов, нанесенных недалеко от кромки бумаги, закрепляют в лотке, который размещают в верхней части камеры. Нижний конец бумаги располагают так, чтобы он не касался налитого на дно камеры растворителя. В результате действия ка-

пиллярных сил и силы тяжести растворитель начинает передвигаться вниз по бумажной полосе, в результате чего смесь разделяется. Нисходящую хроматографию как более простую применяют чаще.

Хроматографирование выполняют в герметично закрытых сосудах, где поддерживают насыщенную парами растворителей атмосферу, что предотвращает их испарение с бумаги. Для эффективного разделения пигментов толщина бумаги должна быть равномерной, а сама бумага — обладать достаточной плотностью.

В зависимости от цели исследования применяют одномерные и двухмерные хроматограммы. В первом случае определяют либо хлорофиллы, либо каротиноиды. Если необходимо осуществить полное разделение смеси пигментов на отдельные компоненты, применяют двухмерную хроматограмму. В этом случае последовательно разгоняют пигменты на бумаге сначала в одном направлении, а затем в направлении, перпендикулярном первому.

Двухмерная хроматография, применяющаяся для массовых количественных определений, сложна и трудоемка. Поэтому в практикуме используют разделение основных пигментов зеленого листа на одномерной хроматограмме, разработанной Хагером. Его методика обладает рядом преимуществ, к числу которых следует отнести большую скорость разделения и получение достаточного количества отдельных пигментов.

Пигменты извлекают из листовой ткани смесью ацетона и бензина с соотношением 4:1 и после фильтрации отделяют бензиновую фракцию, содержащую все пигменты, от ацетона. Полученную в конечном итоге бензиновую фракцию используют для хроматографического разделения пигментов. При хроматографировании получают пять полос пигментов, хорошо отделенных друг от друга, в такой последовательности (от стартовой линии): хлорофилл *b*, хлорофилл *a*, виолаксантин, лютеин и каротины.

Порядок работы. Получение вытяжки. Для анализа отбирают листья определенного яруса, вырезают центральную жилку, а из оставшихся частей берут навеску 0,5 г. Величина навески может меняться в зависимости от содержания пигментов.

Отвешенную пробу быстро измельчают ножницами, переносят в фарфоровую ступку и тщательно растира-

ют с чистым кварцевым песком, предварительно внося в ступку на кончике ножа CaCO_3 для нейтрализации кислот клеточного сока. Затем приливают 3...4 мл смеси ацетона с бензином (24 мл ацетона и 6 мл бензина) и продолжают растирать вместе с растворителями. Смазав снизу носик ступки вазелином, экстракт сливают по палочке в воронку со стеклянным фильтром № 2, соединенную каучуковой трубкой с градуированной вакуумной пробиркой или колбой Бунзена, и отсасывают.

К оставшейся в ступке массе приливают 3...4 мл смеси растворителей и вновь растирают. Затем жидкость сливают в воронку и отсасывают. Экстрагирование пигментов из растительного материала повторяют до тех пор, пока сливная жидкость не станет бесцветной. Далее материал переносят на фильтр, ступку ополаскивают небольшим количеством смеси растворителей и сливают эту жидкость в воронку. Через 2...3 мин отсасывают. После этого объем экстракта количественно доводят смесью растворителей до 25 мл (в случае использования колбы Бунзена экстракт переносят в мерную колбу на 25 мл).

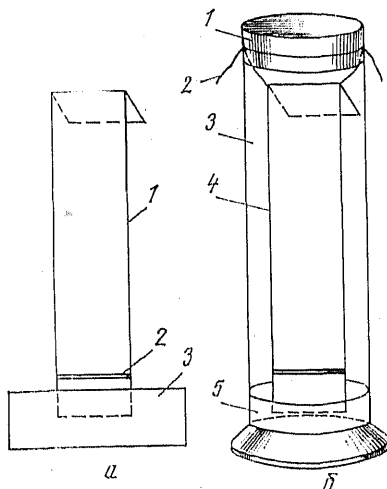
Полученный после фильтрации экстракт переносят в делительную воронку и отмывают от ацетона. Для этого в воронку сначала приливают 20 мл насыщенного раствора NaCl и слегка взбалтывают жидкость. После расслоения водно-ацетоновый слой сливают через кран воронки в приемник. Промывают еще раз 20 мл раствора NaCl , а затем пять-шесть раз 20 мл дистиллированной воды.

Отмытый от ацетона раствор пигментов переносят в градуированную пробирку на 10 мл с хорошо прокаленным сульфатом натрия до объема, соответствующего 2 мл для обезвоживания экстракта. Затем содержимое пробирки доводят бензином до объема 7 мл.

Разделение пигментов. Берут лист хроматографической бумаги размером 25×5 см и на одном его конце, отступив от края 2,5 см, проводят простым карандашом при помощи линейки тонкую линию. Бумагу зажимают между чистыми стеклянными пластинками так, чтобы линия находилась выше пластин (рис. 17). Вдоль линии калиброванной пипеткой с оттянутым носиком наносят 0,5 мл бензинового экстракта пигментов (в виде узкой полосы). Для анализа необходим

Рис. 17. Разделение пигментов:

а — нанесение вытяжки на хроматографическую бумагу; 1 — хроматографическая бумага; 2 — место нанесения смеси пигментов; 3 — стеклянные пластинки; б — общий вид сосуда для восходящей хроматографии: 1 — корковая пробка; 2 — нитка; 3 — стеклянный сосуд; 4 — хроматографическая бумага; 5 — смесь растворителей



сравнительно большой объем раствора, поэтому наносить раствор надо в несколько приемов: каждую следующую порцию после подсушивания предыдущей в токе воздуха от вентилятора или фена.

Зона с вытяжкой пигментов не должна быть шире 0,5 см. После нанесения указанного количества вытяжки противоположный край хроматографической бумаги загибают на 2...2,5 см и закрепляют лист на нитке скрепкой. Подготовленную таким образом бумагу опускают в цилиндр высотой 25 см, диаметром 7 см, со смесью растворителей следующего состава, мл: бензин — 50, бензол — 35, хлороформ — 10, ацетон — 0,5 и изопропиловый спирт — 0,17.

Цилиндр плотно закрывают корковой пробкой или деревянной крышкой, оставив оба конца нитки на его внешней стороне. При помощи концов нитки лист хроматографической бумаги устанавливают в цилиндре так, чтобы его нижний конец был опущен в смесь растворителей на 1 см, а края не касались стенок. После этого цилиндр закрывают темным чехлом из плотной бумаги или ткани. Через 45 мин наблюдается полное разделение пигментов, которые располагаются следующим образом (от места нанесения вытяжки): хлорофилл *b*, хлорофилл *a*, виолаксантин, лютеин, каротины.

Хроматограмму вынимают из цилиндра и просушивают при помощи вентилятора или фена. Затем обводят простым карандашом зоны с соответствующими пигментами и вырезают их ножницами. Полоски разрезают на

мелкие кусочки и помещают в пробирки для элюирования: в первую — с хлорофиллом *b*, во вторую — с хлорофиллом *a*, в третью — с виолаксантином; в четвертую — с лютеином и в пятую — с каротинами. В каждую пробирку наливают по 5 мл ацетона. Элюируют пигменты в течение 15 мин. В элюатах определяют концентрацию пигментов на фотоэлектроколориметре, используя красный светофильтр для хлорофиллов, синий — для каротиноидов.

При колориметрировании каротиноидов в качестве стандартного используют раствор $K_2Cr_2O_7$. На аналитических весах отвешивают 290 мг $K_2Cr_2O_7$, переносят в мерную колбу на 1 л, растворяют в дистиллированной воде, доливают водой до метки и тщательно перемешивают; 1 мл приготовленного раствора по окраске соответствует 2,35 мкг каротина и 2,52 мкг ксантофилла.

Из исходного раствора последовательным разбавлением готовят в мерных колбочках на 100 мл серию стандартных растворов, определяют их оптическую плотность на фотоэлектроколориметре с синим фильтром и на основании полученных данных строят калибровочный график. Данный график используют для установления концентрации каротиноидов. Однако лучше в качестве стандартных применять растворы каротиноидов, концентрацию которых можно определить на спектрофотометре.

Содержание пигментов рассчитывают по формуле (мг/г массы сырых листьев):

$$X = \frac{CVv}{mn},$$

где *C* — концентрация пигмента, найденная по калибровочному графику, мг в 1 мл раствора; *V* — общий объем вытяжки, мл; *v* — объем элюата, мл; *m* — навеска листьев, взятая для анализа, г; *n* — объем вытяжки, нанесенный на хроматографическую бумагу, мл.

Концентрацию пигментов можно определить также на спектрофотометре.

Результаты определения записывают по следующей форме:

Объект	Навеска листьев, г	Объем вытяжки, мл	Объем вытяжки, нанесенной на хроматографическую бумагу, мл	Пигменты	Объем элюата, мл	Показания шкалы барабана	Концентрация пигмента по калибровочной кривой, мг/л	Содержание пигмента, мг/г сухой массы листьев

Материалы и оборудование. Листья растений, ацетон, бензин, бензол, хлороформ, изопропиловый спирт, хлорид натрия (насыщенный раствор), сульфат натрия прокаленный, вазелин, CaCO_3 , кварцевый песок.

Весы, ножницы, ступки с пестиками, вакуумные градуированные пробирки на 25 мл или колбы Бунзена, стеклянные фильтры № 2, воронки делительные, пробирки градуированные на 10 мл, пробирки обыкновенные с пробками, стаканы химические на 150 мл, цилиндры на 50 мл, пипетки на 5 мл, пипетки на 0,5 мл, цилиндры с крышкой или корковой пробкой, обернутые темной бумагой (25×7 см), хроматографическая бумага размером 25×5 см, вентиляторы или фен, штативы для пробирок, предметные стекла, нитки суровые, линейки, ФЭК, насос.

Работа 42. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗА ПО ПОГЛОЩЕНИЮ CO_2 В ТОКЕ ВОЗДУХА

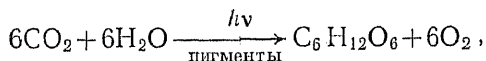
Вводные пояснения. На ход фотосинтеза большое влияние оказывают как внутренние факторы (вид растения, его онтогенетическое состояние, структура и возраст листа, содержание хлорофилла, отток ассимилятов), так и внешние условия (интенсивность света, концентрация CO_2 , температура, уровень снабжения элементами минерального питания и водой).

Для характеристики ассимиляционной деятельности растений обычно пользуются величинами интенсивности фотосинтеза. Наблюдения за изменениями этого показателя имеют важное значение для познания физиологии, сравнительной физиологической оценки растений, их взаимоотношений в фитоценозах.

Значимость подобных исследований особенно возросла в последнее время в связи с разработкой теоретических основ управления фотосинтетической продуктивностью сельскохозяйственных культур и селекцией высокоурожайных форм растений.

Все существующие методы определения интенсивности фотосинтеза основаны на измерении количеств

веществ, участвующих в данном процессе. Исходя из общего уравнения фотосинтеза



в качестве таких показателей можно использовать количества: поглощенного диоксида углерода, выделившегося кислорода, других веществ, а также энергии, поглощенной пигментами или связанной в ассимилятах.

Наиболее часто интенсивность фотосинтеза определяют по поглощаемому диоксиду углерода, реже — по выделяемому кислороду и количеству синтезируемых органических продуктов. Что касается воды, то этот показатель очень трудно использовать из-за высокой оводненности растительных тканей. Учет энергии осуществляют только в специальных исследованиях. Объектами исследования могут служить как отдельные органы — лист, стебель, колос, так и целые растения, фитоценозы. Однако методические приемы определения интенсивности фотосинтеза всех указанных объектов во многом близки. В дальнейшем все определения будут рассмотрены на примере листа.

Сущность метода состоит в учете количества диоксида углерода в потоке воздуха, прошедшего мимо листа растения. Для этого лист заключают в камеру, через которую непрерывно с определенной скоростью продувают воздух, и учитывают разность содержания газа на входе и на выходе камеры. При известном расходе воздуха нетрудно рассчитать количество CO_2 , поглощенного листом. Определяемая величина интенсивности фотосинтеза будет тем достовернее, чем больше разность концентраций диоксида углерода в воздухе на входе и выходе из камеры.

Измерение концентрации CO_2 на входе и выходе камеры выполняют при помощи автоматических газоанализаторов инфракрасного поглощения (ИК-газоанализаторов), непосредственно фиксирующих разность концентраций CO_2 .

При подобного рода определениях необходимо помнить, что вокруг помещенного в камеру листа нарушается естественная среда его функционирования. Чаще всего наблюдается перегрев листа, особенно при интенсивном освещении, что вызывает заметное искажение измеряемого показателя. Избежать искажения можно,

используя камеры определенной конструкции в зависимости от формы листьев. Однако во всех случаях камеры должны иметь минимум «мертвого пространства», т. е. такого, в котором не происходит воздухообмен. При указанном условии обеспечивается равномерное омывание листа воздухом, просасываемым через камеру.

Широко используют камеры-прищепки, которые позволяют работать с небольшими участками листа определенной площади. Камеры изготовляют из органического или обычного стекла.

Интенсивность фотосинтеза принято выражать в миллиграммах CO_2 , усваиваемого 1 дм^2 поверхности листьев в 1 ч. В отдельных случаях расчет ведут на сухую или сырую массу — на 1 г. Следует иметь в виду, что у разных листьев может существенно различаться соотношение между ассимилирующими и неассимилирующими тканями. Кроме того, при расчете на единицу сырой массы учитывают погрешность, обусловленную колебанием оводненности листьев. Интенсивность фотосинтеза иногда рассчитывают на один организм, орган, клетку или на содержание хлорофилла.

Определяемая данным методом интенсивность ассимиляции характеризует так называемый кажущийся, или видимый, фотосинтез. Дело в том, что наблюдаемые при помощи газометрии изменения содержания диоксида углерода — результат двух одновременно идущих на свету процессов — фотосинтеза и дыхания. Чтобы определить истинный фотосинтез, находят количество выделяемого листом CO_2 в темноте и прибавляют его к количеству этого газа, поглощенного на свету. Другими словами, скорость выделения CO_2 на свету принимают равной интенсивности дыхания в темноте. Однако все еще не ясен вопрос, происходит ли дыхание в одинаковой степени на свету и в темноте. Положение особенно осложняется в связи с открытием фотодыхания, т. е. активируемого светом процесса выделения диоксида углерода и поглощением кислорода фотосинтезирующими клетками растений. Все это создает чрезвычайно большие методические трудности для нахождения истинного фотосинтеза.

Величины интенсивности видимого фотосинтеза у растений в естественных фитоценозах варьируют в широких пределах — от 4 до 70 мг CO_2 на 1 дм^2 в 1 ч и

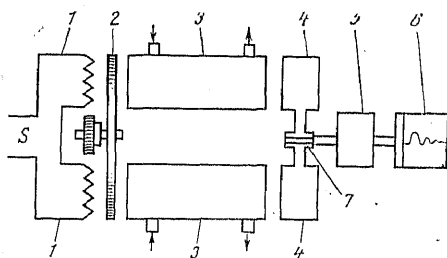


Рис. 18. Схема инфракрасного газоанализатора:

1 — нихромовые спирали;
2 — прерыватель; 3 — трубчатые кюветы; 4 — измерительные камеры лучеприемника; 5 — усилитель электрических сигналов; 6 — регистрирующий прибор; 7 — мембранный конденсатор; S — источник переменного тока

выше. Указанные колебания обусловлены как видовыми особенностями растений, так и условиями среды.

Определение интенсивности фотосинтеза при помощи инфракрасного газоанализатора. Принцип работы инфракрасного газоанализатора основан на свойстве CO_2 избирательно поглощать инфракрасную радиацию в диапазоне волн 4,2...4,3 мкм. Кислород и другие одинаковоатомные газы не поглощают инфракрасные лучи.

Общая схема современного ИК-газоанализатора, при помощи которого можно измерять разность концентраций CO_2 , приведена на рисунке 18. Источником инфракрасной радиации в этом приборе служат нагретые электрическим током нихромовые спирали 1. От двух излучателей одинаковые по интенсивности потоки инфракрасных лучей, прерываемые с определенной частотой прерывателем 2, попадают в трубчатые кюветы 3. Кюветы с обоих концов имеют окошечки, закрытые литий-фтористым стеклом, пропускающим инфракрасную радиацию. Через одну кювету непрерывно продвигают воздух, поступающий в камеру-прищепку, через вторую — воздух, выходящий из камеры с листом.

Потоки инфракрасного излучения, проходя через кюветы газоанализатора, ослабляются пропорционально концентрации CO_2 в них и поступают в измерительные камеры 4 лучеприемника, наполненные постоянной смесью азота и диоксида углерода. В них происходит полное избирательное поглощение инфракрасных лучей. Камеры разделены между собой мембранным конденсатором 7. Так как пучки излучения прерываются, газ в измерительных камерах импульсно нагревается и охлаждается. Соответственно нагрев вызывает расширение газа, а охлаждение — его сжатие.

Подобные периодические перепады давления газа воспринимает мембрана конденсатора. При этом, чем меньше CO_2 в кювете, тем больше инфракрасных лучей проходит в камеру лучеприемника, а следовательно, сильнее нагревается газ и возрастает его давление на мембрану. Это влечет за собой соответствующее отклонение мембраны. В конечном счете ее колебания преобразуются в электрические сигналы, усиливающиеся в усилителе 5 и поступающие далее в регистрирующую часть прибора 6.

Если одна из кювет заполнена азотом, предварительно очищенным от диоксида углерода, и закрыта герметично, то прибор записывает абсолютное содержание CO_2 в исследуемом воздухе и работает по так называемой нормальной схеме. Стандартная шкала газоанализатора, работающего по нормальной схеме и применяемого для измерения интенсивности фотосинтеза, рассчитана на определение содержания диоксида углерода в пределах 0...0,05 %, а газоанализатора, функционирующего по дифференциальной схеме (измеряющего разность концентраций CO_2), — в пределах 0...0,005 %.

Воздух, поступающий в кюветы, обязательно должен быть сухим, так как вода сильно поглощает инфракрасные лучи. Поэтому его предварительно пропускают через U-образные трубки с ангидроном (перхлоратом магния) или хлоридом цинка. Регистрирующее устройство 1 (рис. 19), представляет собой электронный самопишущий прибор КСП-4 (одноточечный). Шкала прибора градуирована в объемных процентах содержания CO_2 .

Ток воздуха через прибор можно создавать при помощи насоса мембранного типа в сочетании с ресивером, сглаживающим неравномерность подачи воздуха, или микрокомпрессором типа МК-1 (по одному на каждую газовую линию). В последнем случае расход воздуха — до 60 л/ч. Микрокомпрессоры могут работать на нагнетание и всасывание (подключают в систему соответственно до или после камеры). Расход воздуха устанавливают по реометру с жидкостным наполнением, градуировку которого выполняют при помощи газового счетчика ГСБ-500 или ротаметра заводского изготовления.

Скорость подачи воздуха через камеру подбирают таким образом, чтобы разность концентраций CO_2 на

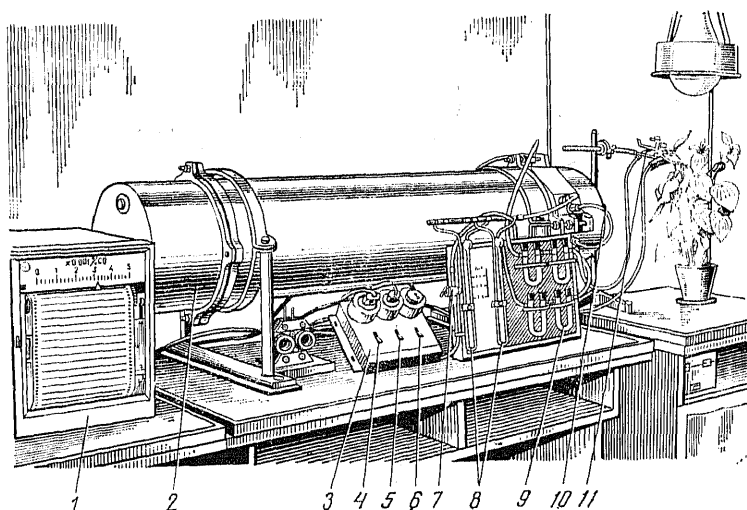


Рис. 19. Инфракрасный газоанализатор ГИП-10:

1 — самописец КСП-2; 2 — газоанализатор; 3 — панель включения узлов установки; 4 — включатель газоанализатора; 5 — включатель пневмонасосов; 6 — включатель самописца; 7 — краны реометров; 8 — реометры; 9 — осушители U-образные трубки; 10 — винт установки на «0»; 11 — ассимиляционная камера-прищепка

входе и выходе была в пределах шкалы. Так, при работе с газоанализатором ГИП-10 со шкалой 0...0,005 % разность концентраций CO_2 может лежать в пределах 0,001...0,0035 %. Это исключает голодание листа в отношении диоксида углерода, одновременно соблюдается условие нахождения листа в атмосфере, близкой по составу к обычной, т. е. без значительного перепада содержания CO_2 в пределах камеры. При расходе воздуха 30...60 л/ч в камерах-прищепках обеспечиваются условия теплообмена, близкие к естественным.

Основное достоинство инфракрасных газоанализаторов — то, что они позволяют вести непрерывную автоматическую регистрацию интенсивности фотосинтеза на одном и том же объекте длительный период как в лабораторных, так и в полевых условиях.

Включают прибор в сеть 4. Затем последовательно включают пневмонасосы 5, самописец 6 и выравнивают потоки воздуха, идущие в кюветы, до определенной скорости по реометрам 8. Через 60 мин после включе-

ния прибор устанавливают на «0» при помощи винта 10 (примерно четвертое деление от начала шкалы самописца) и записывают ее значение в делениях шкалы КСП-4. Далее включают источник освещения, накладывают на лист растения камеру-прищепку 11 и после установления стационарного уровня фотосинтеза отмечают положение экспериментальной точки.

Интенсивность фотосинтеза рассчитывают по формуле, мг CO_2 на 1 дм^2 за 1 ч:

$$\Phi = \frac{(b-a) \cdot KV \cdot 100}{S},$$

где a — положение нулевой точки на шкале самописца; b — положение экспериментальной точки на шкале самописца; K — цена деления шкалы прибора КСП-4, мг CO_2 (0,0019 мг для ГИП-10 со шкалой 0...0,005 % об.); V — скорость потока воздуха, л/ч; S — площадь участка листа в камере, см^2 ; 100 — множитель для перевода в дм^2 .

Результаты записывают по следующей форме:

Вариант	Освещенность, лк	Температура воздуха, $^{\circ}\text{C}$	Площадь участка листа (S), см^2	Скорость потока воздуха (V), л/ч	Положение нулевой точки, a	Положение экспериментальной точки, b	Интенсивность фотосинтеза, мг CO_2 на 1 дм^2 за 1 ч

Материалы и оборудование. Растения фасоли или подсолнечника, ангидрон (перхлорат магния) или хлорид цинка.

Инфракрасный газоанализатор; камеры-прищепки герметизированные; реометры, заполненные маслом (трансформаторное); U-образные трубки для осушителей; миллиметровая бумага; штативы для закрепления ассимиляционной камеры; лампы для освещения.

Работа 43. ФОТОКОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ УГЛЕРОДА В ЛИСТЬЯХ МОКРЫМ СЖИГАНИЕМ В ХРОМОВОЙ СМЕСИ ПО Х. К. АЛИКОВУ

Вводные пояснения. Конечный результат фотосинтеза — восстановление углерода из диоксида углерода и аккумуляция его в синтезируемых органических веществах. Поскольку между количеством образующихся ассимилятов и фотосинтетической активностью листа существует прямая зависимость, то по накоплению углерода

органического вещества можно судить об интенсивности фотосинтеза.

В простейшей форме сущность метода сводится к следующему: из листа соответствующего яруса высекают сверлом диски определенной площади и устанавливают содержание углерода в них. После пребывания растения на свету в течение 2...3 ч из оставшейся части листовой пластинки вновь берут такое же число дисков для вторичного определения. Количество накопленного углерода органического вещества находят по разности между содержанием его в конце и начале опыта, а потом рассчитывают на единицу листовой поверхности и единицу времени.

Углерод органических веществ учитывают методом мокрого сжигания, разработанным И. В. Тюриным для определения гумуса в почве и модифицированного для растительного материала. Окисление углерода проводят 0,4 н. раствором бихромата калия в присутствии серной кислоты. Неизрасходованное количество бихромата калия устанавливают обратным титрованием 0,2 н. раствором соли Мора. В качестве индикатора применяют дифениламин, который в восстановленной форме бесцветен, а при окислении переходит в дифенилбензидин-виолет сине-фиолетового цвета.

Х. К. Аликов предложил вместо титрования бихромата калия солью Мора определять непосредственно восстановленный Cr^{+3} колориметрическим методом. Последнее основано на том, что при окислении растительного материала хромовой смесью ионы Cr^{+6} желтого цвета восстанавливаются до ионов Cr^{+3} синего цвета. Количество образовавшихся ионов Cr^{+3} находится в линейной зависимости от содержания органического углерода, подвергшегося окислению. Измерение концентрации ионов Cr^{+3} выполняют на фотоэлектроколориметре с желтым светофильтром ($\lambda_{\text{max}} = 582 \text{ нм}$). В этом случае ионы Cr^{+6} практически не мешают определению ионов Cr^{+3} .

Преимущество фотоколориметрического метода состоит в том, что он освобождает экспериментатора от целого ряда операций, связанных с титрованием, приготовлением растворов соли Мора, окислительно-восстановительного индикатора и др. Кроме того, последний метод позволяет с большей точностью определять содержание углерода в растительном материале. Его

можно использовать в лабораторных и полевых условиях для сравнительных исследований. Однако при этом надо очень тщательно подходить к отбору растений, особенно при работе в поле. Важное значение имеет также число повторностей при самом определении органического углерода в листьях. Чтобы получить сравнимые и воспроизводимые данные, каждое определение должно состоять, по крайней мере, из трех-четырех анализов.

Значительные погрешности метода связаны с трудностью учета затрат органических веществ на дыхание и отток их из листа в другие органы растения. Все перечисленные моменты не обесценивают описанный метод, но о них нужно помнить в тех случаях, когда на основании полученных с его помощью данных делают далеко идущие выводы.

Порядок работы. Сверлом вырезают из листа определенного яруса диски (оптимальное количество которых необходимо определить до начала опыта) и помещают их в пробирку (или коническую колбу), в которую из бюретки приливают 10 мл 0,2 н. хромовой смеси. Реакционную смесь слабо кипятят в течение 5 мин на песчаной бане, газовой горелке с асбестовой сеткой или электрической плитке. После полного охлаждения раствор из пробирки количественно переносят дистиллированной водой в мерную колбу на 50 мл, доводят до метки и тщательно перемешивают. Оптическую плотность раствора определяют в кювете с толщиной слоя 3 см на фотоэлектроколориметре с желтым фильтром № 7. Одновременно выполняют контрольное определение (без растительного материала), тщательно соблюдая все указанные выше операции.

Показания шкалы барабана переводят в величины концентрации глюкозы при помощи калибровочного графика. Для этого в десять пробирок приливают соответственно 0,1; 0,2 и т. д. до 1,0 мл стандартного раствора глюкозы и по 10 мл 0,2 н. хромовой смеси. В одиннадцатую пробирку только 10 мл хромовой смеси. Содержимое всех пробирок слабо кипятят в течение 5 мин. После охлаждения растворы из пробирок количественно переносят в мерные колбы на 50 мл, доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают и измеряют оптическую плотность (D) в кювете с толщиной слоя 3 см (светофильтр № 7). На оси абсцисс откла-

дывают концентрацию глюкозы (мг на 50 мл), а на оси ординат — соответствующие им значения оптической плотности. Точки пересечения соединяют и получают калибровочный график.

Наиболее точно определить содержание органического вещества в растительном материале в пересчете на углерод можно при оптической плотности опытных растворов в пределах $0,40 \pm 0,15$.

Учитывая соотношения атомной (или молекулярной) массы, выполняют пересчет органического вещества на углерод (M_C) или диоксид углерода (M_{CO_2}):

$$M_C = 0,4 M_{ГЛ}; \quad (1)$$

$$M_{CO_2} = 1,47 M_{ГЛ}, \quad (2)$$

где $M_{ГЛ}$ — количество глюкозы, соответствующее содержанию органического вещества в растительной пробе, мг; 0,4 и 1,47 — коэффициенты пересчета соответственно на углерод и диоксид углерода.

Количество углерода органического вещества (в мг), содержащегося в кусочке листа площадью в 1 дм^2 , рассчитывают по формуле

$$X = \frac{0,4 M_{ГЛ} 100}{S}, \quad (3)$$

где S — площадь высечек, см^2 , остальные обозначения те же, что в формулах (1) и (2).

Результаты опыта записывают по форме (табл. 26).

26. Определение интенсивности фотосинтеза

Объект или вариант	Время определения	Площадь высечек, см^2	Объем раствора, мл	Показания на шкале бара-ба-а	Содержание глюкозы по калибровочному графику, мг на 50 мл	Содержание углерода, мг/дм ²	Интенсивность фотосинтеза, мг углерода на 1 дм^2 листа в 1 ч
--------------------	-------------------	--------------------------------	--------------------	------------------------------	---	---	--

Начало опыта
После пребывания на свете
в течение 2 ч

Материалы и оборудование. Растения кукурузы, пшеницы или подсолнечника. Пробирки (или конические колбы) на 100 мл, бюретки, мерные цилиндры на 100 мл, побочные сверла диаметром 5...10 мм, фотоэлектроколориметр ФЭК-56М.

Приготовление хромовой смеси, содержащей катализатор. Для приготовления 1 л 0,4 н. раствора бихромата калия $19,614 \text{ г } K_2Cr_2O_7$ растворяют в 500 мл дистиллированной воды, переносят в мерную колбу на 1 л. В качестве катализатора приливают 10 мл

10 %-го раствора CuSO_4 и раствор доводят до метки водой. Хромовую смесь 0,2 н. концентрации, необходимую для фотоколориметрического определения углерода, получают разбавлением 0,4 н. раствора $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ концентрированной H_2SO_4 в соотношении 1:1.

Приготовление стандартного раствора глюкозы. В мерную колбу на 100 мл вносят 1 г глюкозы, растворяют ее в небольшом объеме дистиллированной воды, а затем доводят до метки; 1 мл приготовленного раствора содержит 10 мг глюкозы.

Работа 44. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗА

Вводные пояснения. На долю органических соединений, создаваемых в ходе фотосинтеза, приходится около 95 % общей биомассы растительного организма. Поэтому изменение сухой массы может довольно объективно отражать ассимиляционную деятельность растений. Именно этот показатель положен в основу метода определения «нетто-ассимиляции», или чистой продуктивности фотосинтеза (ЧПФ).

Чистая продуктивность фотосинтеза представляет собой прирост сухой массы растений в граммах за определенное время (сутки), отнесенный к единице листовой поверхности (м^2). Ее учитывают периодическим отбором проб растений, у которых определяют общую массу, массу отдельных органов и площадь листьев. Далее «нетто-ассимиляцию» (в г/м^2 за 1 сут) рассчитывают по формуле

$$\text{ЧПФ} = \frac{B_2 - B_1}{0,5(L_1 + L_2)}, \quad (1)$$

где B_1 и B_2 — сухая масса растений в начале и в конце учетного периода; $(B_2 - B_1)$ — прирост сухой массы за n дней; L_1 и L_2 — площади листьев в начале и в конце периода, м^2 ; $0,5(L_1 + L_2)$ — средняя рабочая площадь листьев за время опыта; n — период между двумя наблюдениями, дней.

При использовании формулы (1) допускают, что листовая поверхность за время наблюдения нарастает равномерно. В действительности в большинстве случаев площадь листьев увеличивается неравномерно. В связи с этим зарубежными исследователями предложена иная формула для определения чистой продуктивности фотосинтеза:

$$\text{ЧПФ} = \frac{(B_2 - B_1)(1nL_2 - 1nL_1)}{(L_2 - L_1)n}, \quad (2)$$

где $\ln L_1$ и $\ln L_2$ — натуральные логарифмы показателей площадей листьев в начале и в конце учитываемого периода; остальные показатели те же, что и в формуле (1).

Уравнение (2) наиболее удовлетворительно выражает зависимость «нетто-ассимиляции» от прироста сухого вещества и динамики нарастания листовой поверхности, однако проще пользоваться первой формулой. Следует иметь в виду, что чем больше разрыв между пробами, тем менее точными будут результаты определения. Оптимальное время между пробами составляет 7...10 дней, в периоды интенсивного роста растений оно может быть сокращено до 5 дней.

Другой источник погрешностей метода связан с трудностью отбора проб растений, обусловленной большим разнообразием культур, ценозов и условий произрастания.

Невозможно точно учесть и изменения массы подземных частей, которые у ряда растений служат основным местом накопления пластических веществ. Кроме того, часть фотосинтетически усвоенного углерода расходуется на дыхание и экзоосмос. Наконец, в период физиологической зрелости растений наблюдается стабилизация массы сухого вещества, а с возрастом отмечается даже снижение количества биомассы в результате отмирания части листового аппарата и других органов растения. Однако скорость фотосинтеза у функционирующих листьев может не меняться или меняться очень слабо.

В данном случае показатель «нетто-ассимиляции» уже не будет отражать реальное состояние фотосинтетической активности растений. Перечисленные обстоятельства необходимо учитывать при использовании рассматриваемого метода. Метод определения «нетто-ассимиляции» эффективен при исследовании фотосинтеза в природных условиях. Он позволяет получать ценный материал для изыскания наиболее рациональных путей повышения продуктивности культурных и естественных ценозов, прогнозирования и программирования урожаев, целесообразного географического размещения сельскохозяйственных растений.

Показатели чистой продуктивности фотосинтеза в природных условиях обычно колеблются от 0,1 до 20 г и более сухого вещества на 1 м² площади листьев в сутки: у злаков в фазе интенсивного роста — 40...50, у

основных сельскохозяйственных культур при благоприятных условиях — 4...10 г/м² в 1 сут.

Порядок работы. На опытных посевах берут пробы растений. Для уменьшения разброса результатов в пробу включают наиболее типичные и однородные для данного посева и фазы развития экземпляры. У злаков, например, берут не менее пяти-десяти параллельных проб, каждая из которых состоит из 10...20 растений. В пробу включают все опавшие и засохшие листья и побеги. Отобранные растения помечают этикетками, заворачивают в бумагу и переносят для анализа в лабораторию, где быстро разделяют на отдельные органы и каждую часть взвешивают. Пожелтевшие или отмершие листья учитывают отдельно.

Дальнейшая обработка материала заключается в отборе проб для определения сухого вещества в отдельных органах растений и измерении площади листьев.

Для нахождения содержания сухого вещества из растительной массы каждой части (%) берут две-три порции материала, помещают в бюксы (или металлические стаканчики), взвешивают и высушивают в термостате при 105 °С до постоянной массы. Затем рассчитывают содержание сухого вещества и устанавливают массу абсолютно сухих частей, а в конечном итоге — общую сухую массу растений, взятых для исследования.

Площадь листьев определяют по одному из методов, описанных в работе 45. Определение следует выполнять быстро и только на зеленых листьях.

Через семь — десять дней таким же образом вновь отбирают растения и повторяют описанные определения. Чистую продуктивность фотосинтеза рассчитывают по формуле (1).

Если наблюдения провести в течение вегетации растений, можно получить ценные данные о продуктивности работы листьев в отдельные периоды жизни исследуемой культуры или в зависимости от условий ее произрастания. Результаты наблюдений записывают по форме (табл. 27).

Материалы и оборудование. Растения пшеницы, ячменя, овса, кукурузы.

Технические и аналитические весы, термостат, бюксы или металлические стаканчики, пожницы, бумага.

27. Определение чистой продуктивности фотосинтеза

Дата наблюдения	Вариант	Повторность	Число растений в пробе	Сырая масса, г				Сухая масса, г				Площадь листьев, см ²	Чистая продуктивность фотосинтеза, г/м ² в 1 сут
				листьев	стеблей	соцветий	общая	листьев	стеблей	соцветий	общая		

Работа 45. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЛОЩАДИ ЛИСТЬЕВ

Вводные пояснения. При изучении интенсивности фотосинтеза, дыхания, транспирации чаще всего получаемые величины рассчитывают на единицу листовой поверхности, поэтому возникает необходимость ее измерения. Определение площади листьев имеет и самостоятельное значение при установлении листового индекса, фотосинтетического потенциала и пр.

Листовой индекс — это отношение общей площади листьев растений к площади посева. В зависимости от культуры и условий произрастания его показатель обычно варьирует от одного до семи и выше, по нему можно судить о степени обеспеченности посева водой и элементами минерального питания. Установлено, что у большинства сельскохозяйственных растений оптимальный листовой индекс составляет $4...5 \text{ м}^2 \cdot \text{м}^{-2}$ посева.

Для характеристики фотосинтетической работы посева предложен специальный показатель — фотосинтетический потенциал. Его находят, суммируя площади листьев (м^2 на 1 га посева за каждые сутки вегетационного периода или определенной его части). Для хороших посевов фотосинтетический потенциал за вегетацию составляет на 1 га $2,2...3 \text{ млн м}^2/(\text{га} \cdot 1 \text{ сут})$, средних — $1,0...1,5 \text{ млн}$ и плохих — $0,5...0,7 \text{ млн м}^2/(\text{га} \cdot 1 \text{ сут})$. Данный показатель хорошо коррелирует с показателем урожайности. Например, фотосинтетический потенциал около $3 \text{ млн м}^2/(\text{га} \cdot 1 \text{ сут})$ может обеспечить получение $4...6 \text{ т/га}$ зерна или $70...80 \text{ т/га}$ корне- и клубнеплодов.

Для определения площади листовой поверхности разработано множество методов и приемов. Ниже приведены некоторые из них.

Порядок работы. Метод отпечатков. Лист растения накладывают на однородную бумагу и обводят контур остро отточенным карандашом. Отпечаток листа можно получить и при помощи светочувствительной бумаги. Для этого лист кладут на светочувствительную бумагу, прижимают к ней стеклянной пластинкой и выставляют на солнечный свет или освещают яркой электрической лампой в течение 3...5 мин. Затем контур отпечатка обводят карандашом. Иногда светочувствительную бумагу с отпечатками листьев помещают на 1...2 мин в эксикатор, на дно которого предварительно наливают раствор аммиака. Под влиянием его паров получают четкие контуры листовых пластинок. Проявленные отпечатки листа можно хранить очень долго.

Получив тем или иным способом отпечаток листа, определяют его площадь. Если бумага по толщине равномерная, используют весовой метод, для чего вырезают ее по контуру листовой пластинки и взвешивают на торсионных или аналитических весах. Одновременно из такой же бумаги вырезают квадрат, например площадью 100 см² (10×10 см), и также определяют его массу. Площадь исследуемого листа находят по формуле

$$S = aC/b,$$

где a — масса контура листа, мг; b — масса квадрата бумаги, мг; C — площадь квадрата бумаги, см².

Описанный метод широко применяют, он прост и достаточно точен, но малопроизводителен. Кроме того, его практически нельзя использовать при исследовании гофрированных и сложных листьев.

Метод высечек. Это наиболее доступный и продуктивный метод, особенно ценный в полевых опытах. Суть его в следующем. Отбирают среднюю пробу растений, быстро срезают листья и определяют их массу. Затем из каждого листа выбивают сверлом определенного диаметра несколько высечек, объединяют вместе и устанавливают их массу. Диаметр сверла выбирают в зависимости от размеров листовой пластинки и ее поверхностной плотности. Площадь листьев определяют по формуле

$$S = ac/b,$$

где a — общая масса сырых листьев, г; b — общая масса сырых высечек, г; c — общая площадь высечек, см².

Недостаток метода — относительно невысокая точность.

Определение площади листа по его параметрам. Метод основан на сопоставлении фигуры листа с некоторой простой геометрической фигурой, достаточно хорошо совпадающей с конфигурацией данного листа.

Лист вписывают в соответствующую фигуру так, чтобы основные параметры их были общими. Так, листья злаков легко вписываются в вытянутый прямоугольник. Измеряя ширину (a) и длину (b) такого прямоугольника, находят его площадь (S), которая равна $S=ab$. Однако листовая пластинка не занимает всю площадь прямоугольника, и действительная площадь листа ($S_{\text{л}}$), определенная, положим, методом отпечатков, будет меньше площади фигуры (S). Поэтому устанавливают поправочный коэффициент K , равный отношению $S_{\text{л}}/S$. Отсюда фактическая площадь листа злака будет равна $S_{\text{л}}=abK$.

Аналогично находят поправочные коэффициенты для листьев других растений, моделируя их с соответствующими геометрическими фигурами. Причем коэффициент K получают на основании анализа многих листьев и несколько раз в течение вегетационного периода, так как нередко конфигурация листьев претерпевает значительные возрастные изменения. Кроме того, систематически проверяют применимость ранее рассчитанных поправочных коэффициентов.

Метод определения площади листьев по параметрам можно использовать только при работе с растениями, имеющими сравнительно простую и устойчиво сохраняющуюся форму. Метод характеризуется простотой, относительно высокой производительностью, возможностью определения листовой поверхности без отделения листьев от растений. Одновременно ему присуща невысокая точность.

Автоматическое планиметрирование. Для определения площади листьев все больше применяют различные модели фотопланиметров: с параллельным пучком, с интегрирующей сферой, со сканирующим лучом. Основное преимущество фотопланиметров — высокая производительность. Однако работать с ними

можно только на отделенных от растения листьях и в лабораторных условиях. Кроме того, фотопланиметры имеют ряд существенных конструктивных недостатков, служащих источником различного рода ошибок.

Материалы и оборудование. Растения пшеницы, ячменя, подсолнечника, свеклы.

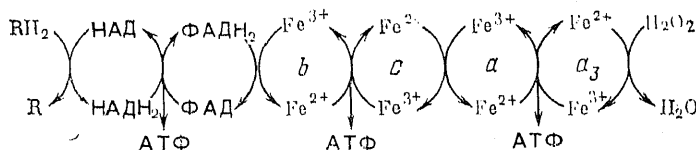
Торзионные или аналитические весы, обычная и светочувствительная бумага, линейки, сверла, пожирцы, стеклянные пластинки, эксикатор с аммиаком, электрические лампы на 300 Вт.

Глава 5

ДЫХАНИЕ

Дыханием называют окислительный распад сложных органических веществ, в первую очередь углеводов, до простейших конечных продуктов — диоксида углерода и воды, сопровождающийся выделением энергии. Суммарно его выражают уравнением $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow CO_2 + 6H_2O + 2721,8 \text{ кДж}$. Процесс представляет сложные превращения, протекающие в определенной последовательности при участии многих ферментов.

Значительная часть энергии, освобождающейся в результате окисления органических веществ, фиксируется в макроэргических фосфатных связях АТФ и используется на различные жизненные процессы растений — биосинтез, активное поглощение и транспорт веществ, поддержание клеточной структуры и др. Образование АТФ происходит с потреблением кислорода. В анаэробных условиях или при подавлении дыхания действием различных химических веществ реакция не идет. В связи с тем что фосфорилирование с образованием АТФ происходит лишь при окислении органических веществ, процесс получил название окислительного фосфорилирования. Выяснение механизма окислительного фосфорилирования, как и механизма фотосинтетического фосфорилирования, остается одной из самых важных и трудных задач биологических наук. Данный процесс протекает в основном в митохондриях при окислении водорода, отнятого от дыхательного субстрата при участии дегидрогеназ, до воды с участием цитохромной системы по схеме:



где RH_2 — дыхательный субстрат; НАД и ФАД — дегидрогеназы; b , c , a — цитохромы; a_3 — цитохромоксидаза; АТФ — показаны участки фосфорилирования.

Таким образом, в дыхательной цепи происходит три реакции фосфорилирования. Многоступенчатый перенос водорода и электрона способствует постепенному выделению энергии малыми порциями, что создает условия для эффективного использования ее в клетке. Окислительное фосфорилирование — очень неустойчивый процесс. При повреждении внутриклеточных структур образование АТФ немедленно прекращается. Объясняется это тем, что окислительное фосфорилирование происходит только в неповрежденных митохондриях. Митохондрии — основные центры накопления энергии в клетке, и при нарушении их структуры указанный процесс прекращается. Современные представления о механизме окислительного фосфорилирования далеко не полные и в значительной степени упрощены. Однако и упрощенные схемы дают возможность судить о том, каким образом в живых клетках вследствие окисления веществ образуется АТФ — основной источник энергии в организмах.

В клетках есть и побочные пути окисления, связанные с участием других оксидазных систем — полифенолоксидазной, аскорбатоксидазной. Физиологическое значение данных путей в основном состоит в окислении избытка некоторых продуктов обмена веществ, например, полифенолов и их производных, служащих ингибиторами метаболизма.

Часть образующихся в процессе дыхания восстановленных коферментов (НАД·Н и особенно НАДФ·Н) используется на восстановительные процессы: восстановление нитратов до аммиака, восстановительное аминирование кетокислот и др. Постепенный распад сахаров сопровождается образованием разнообразных промежуточных продуктов, необходимых для синтеза аминокислот, белков, жиров, углеводов и других веществ.

Будучи тесно связанным со всей жизнедеятельностью растений, дыхание наряду с фотосинтезом оказывает

непосредственное влияние на их продуктивность. Дыханию принадлежит важная роль в обеспечении защитных реакций растений.

Наиболее общий показатель скорости окисления — интенсивность дыхания, о которой можно судить по поглощению кислорода, выделению диоксида углерода и окислению органического вещества. Другие показатели дыхательного метаболизма: величина дыхательного коэффициента, соотношение гликолитического и пентозофосфатного путей распада сахаров, активность окислительно-восстановительных ферментов. Об энергетической эффективности дыхания можно судить по интенсивности окислительного фосфорилирования митохондрий.

Перечисленные показатели могут быть использованы для характеристики физиологических свойств и состояния растений.

Работа 46. ОБНАРУЖЕНИЕ ДЕГИДРОГЕНАЗ В РАСТЕНИИ ПО ВОССТАНОВЛЕНИЮ ДИНИТРОБЕНЗОЛА

Вводные пояснения. Дегидрогеназы — ферменты, катализирующие отщепление водорода от дыхательного субстрата и перенос его к промежуточным или конечным акцепторам водорода.

Обнаружение дегидрогеназ основано на введении в живую растительную ткань акцептора водорода — динитробензола, восстановление которого сопровождается изменением окраски ткани. При недостатке кислорода бесцветный орто- и парадинитробензол, присоединяя водород от восстановленных дегидрогеназ, необратимо восстанавливается в дышащих тканях в желтый орто- и пара-нитрофенилгидроксиламин и далее в орто- и пара-нитроанилин также желтого цвета.

Орто- и паранитрофенилгидроксиламин дают в щелочной среде соответственно фиолетовое и красное окрашивание, а вместе — пурпурное.

Порядок работы. В две пробирки наливают по 5 мл насыщенного раствора динитробензола*. Из свежего клубня картофеля вырезают два одинаковых столбика

* Динитробензол ядовит. После работы с ним тщательно моют руки.

длиной 3...4 см, толщиной и шириной около 1 см. Ткани одного из них убивают кипячением в воде в течение 1...2 мин (после кипячения пробирку охлаждают). В каждую пробирку с раствором динитробензола погружают по одному столбику и выдерживают 1...3 ч при комнатной температуре или в термостате при 30...35 °С.

В конце опыта сравнивают окраску столбиков и растворов в обеих пробирках. Затем подщелачивают содержимое пробирок, прибавив 10...15 капель аммиака, и через 5...15 мин, когда аммиак проникнет в ткани столбиков, вновь сравнивают окраску. Делают выводы по результатам опыта. Результаты опыта записывают по форме (табл. 28).

28. Обнаружение дегидрогеназ в растении

Ткань	Окраска ткани и раствора в конце опыта	
	без добавления аммиака	после добавления аммиака

Живая
После кипячения

Материалы и оборудование. Клубни картофеля, насыщенный раствор динитробензола, 10 %-й раствор аммиака.

Ножи, мерные цилиндры на 10 мл, пипетки на 1 мл, фарфоровые тарелки или стеклянные пластинки, штативы с пробирками.

Работа 47. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДЕГИДРОГЕНАЗ МЕТОДОМ ВАКУУМ-ИНФИЛЬТРАЦИИ ПО ПЫЛЬНЕВУ

Вводные пояснения. В основу метода положена способность дегидрогеназ восстанавливать бесцветные соли тетразолия с образованием окрашенного формазана. Бесцветный 2,3,5-трифенилтетразолий, присоединяя водород, восстанавливается до формазана красного цвета. Формазан нерастворим в воде, но хорошо растворяется в ацетоне или изопропиловом спирте.

Метод позволяет работать с навесками материала небольшой массы и выявлять активность дегидрогеназ как в бесцветных, так и в окрашенных пигментами тканях. При работе выбирают однородный материал и

разрезают крупные объекты на пластинки толщиной 1,5...2 мм.

Порядок работы. В маленькие бюксы берут три навески по 30...100 мг предварительно разрезанного на пластинки растительного материала. Две навески заливают 5 мл раствора трифенилтетразолия, приготовленного на буферной смеси, третью (контрольную) погружают в 5 мл чистой буферной смеси. Исследуемый материал сверху придавливают небольшим грузом (стеклянной пробкой) и помещают в вакуум-экссикатор, из которого масляным насосом выкачивают воздух. После прекращения выделения пузырьков в течение 1...2 мин снова впускают воздух, под давлением которого раствор начинает проникать в ткани. Бюксы закрывают крышками и переносят на 30 мин в термостат с температурой 37°C, где ткани приобретают красный цвет, интенсивность которого зависит от активности дегидрогеназ.

Затем каждую пробу вынимают из бюкса и тщательно растирают в ступке с небольшим количеством ацетона или изопропилового спирта. Содержимое ступки переносят в мерный цилиндр и доводят объем до 5...10 мл в зависимости от интенсивности окраски. Остатки измельченной ткани должны полностью обесцветиться.

После растирания все пробы центрифугируют в течение 3 мин при интенсивности вращения 1500 мин⁻¹, и полученный окрашенный формазаном экстракт сразу колориметрируют на ФЭК при синем светофильтре. Если контрольная вытяжка зеленая, то, чтобы снять цвет хлорофилла, колориметрируют при зеленом светофильтре. Активность дегидрогеназ представляет собой разницу оптических плотностей по показаниям ФЭК в опытных и контрольных пробах. Эту разницу, выраженную в целых числах, называют индексом активности дегидрогеназ.

Результаты опыта записывают по следующей форме:

Объект	Навеска ткани, мг	Оптическая плотность		Индекс активности дегидрогеназ
		контроль	опыт	

Материалы и оборудование. Проростки злаков; клубни картофеля или другой растительный материал; $1/15$ М буферная смесь Серенсена III с рН 7,17; хлорид 2, 3, 5-трифенилтетразолия (0,25... 0,5 %-й раствор), приготовленный на буферной смеси Серенсена III; ацетон или изопропиловый спирт.

Бюксы, мерные цилиндры на 10 мл, лезвия безопасной бритвы, фарфоровые ступки, весы торзионные или аналитические, стеклянные пробки, вакуум-эксикаторы, насос Камовского, термостат, центрифуга, фотоэлектроколориметр.

Приготовление буферной смеси Серенсена III. Для приготовления $1/15$ М буферной смеси Серенсена III с рН 7,17 в 100 мл дистиллированной воды растворяют 0,831 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 0,272 г KH_2PO_4 .

Работа 48. ОБНАРУЖЕНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕЕ АКТИВНОСТИ

Вводные пояснения. Пероксидаза — фермент, катализирующий окисление полифенолов и некоторых ароматических аминов при помощи кислорода, перекиси водорода или органических перекисей. Пероксидаза образует с перекисью водорода комплексное соединение, в результате чего перекись активируется и приобретает способность действовать как акцептор водорода.

Порядок работы. Обнаружение пероксидазы в соке клубня картофеля. Основано на изменении окраски при окислении полифенолов в хиноны. Натирают на терке очищенный клубень картофеля. Из мяки отжимают сок через марлю и собирают в колбочку. В четыре пробирки вносят по 5 мл 1 %-го раствора гидрохинона. В первую добавляют, кроме того, 1 мл 3 %-го раствора перекиси водорода и 1 мл картофельного сока, во вторую — 1 мл 3 %-го раствора перекиси водорода, в третью — 1 мл картофельного сока, в четвертую 1 мл предварительно прокипяченного в течение 1 мин картофельного сока и 1 мл перекиси водорода.

При окислении гидрохинона в хинон раствор буреет. Наблюдается некоторое побурение самого картофельного сока без добавления гидрохинона и перекиси водорода, что связано с действием полифенолоксидазы, окисляющей полифенолы тканей картофеля с участием молекулярного кислорода.

Отмечают окраску в пробирках и делают выводы. Результаты опыта записывают по форме (табл. 29).

Определение активности пероксидазы по Бояркину. Метод основан на изменении времени, за которое опытный раствор достигает определенной

29. Обнаружение пероксидазы в соке картофеля

Вариант	Состав смеси в пробирке			Окраска раствора в пробирках
	картофельный сок (носитель пероксидазы)	перекись водорода	гидрохи-кон	
1	+	+	+	
2	—	+	+	
3	+	—	+	
4	+	+	+	

оптической плотности. В качестве субстрата используют бензидин, в результате окисления которого образуется соединение синего цвета.

Растирают в ступке с водой (или с ацетатным буферным раствором рН 5,4) 50...100 мг растительного материала, затем переносят его в мерную колбочку на 25 мл и доводят до метки. Настаивают вытяжку 5...10 мин и центрифугируют в течение 10 мин при интенсивности вращения 3000 мин^{-1} . Осадок отбрасывают. В надосадочной жидкости определяют активность пероксидазы, о которой судят по времени образования синей окраски окисленного бензидина. Для измерения активности лучше брать такие разведения вытяжки, при которых окраска изменяется в течение 10...40 с, так как активность фермента прямо пропорциональна его концентрации только в самом начале реакции. Определения ведут на ФЭК с желтым светофильтром.

В две кюветы толщиной 2 см наливают по 2 мл вытяжки, 2 мл буферного раствора, 2 мл бензидина в каждую. Ставят кюветы в кюветодержатели прибора, одну слева (контроль), другую справа (опыт), при помощи оптических клиньев уравнивают оба световых потока (при этом стрелка гальванометра встает в нулевое положение). Уравнивают световые потоки сначала при чувствительности «1», затем при чувствительности «2», при которой и ведут определение. Правый отсчетный барабан ставят на деление 0,250 шкалы оптической плотности, при этом стрелка гальванометра смещается в сторону.

В левую кювету наливают 2 мл воды, в правую — 2 мл 0,03 %-го раствора перекиси водорода пипеткой с широким носиком. При этом сильная струя перемешивает содержимое кюветы. Одновременно с падением

первой капли включают секундомер. В опытной кювете раствор синее, стрелка гальванометра передвигается к нулевому положению. Отмечают время от начала приливания перекиси водорода до достижения раствором заданной оптической плотности; при этом стрелка гальванометра достигает нулевого положения. Проводят три определения и берут среднее значение. Активность фермента рассчитывают по формуле

$$A = \frac{D \cdot (\alpha \cdot \beta \cdot \gamma)}{td},$$

где D — оптическая плотность, равная 0,250; d — толщина слоя жидкости (толщина кюветы), см; t — время, с; α — отношение количества жидкости, взятой для приготовления вытяжки, мл, к массе навески, г; β — степень дополнительного разведения вытяжки (если это потребуется); γ — степень постоянного разведения вытяжки в реакционной смеси (при данных условиях — 4).

Результаты отражают изменение оптической плотности за 1 с на 1 г сырой массы ткани. Определяют активность пероксидазы в листьях верхнего и нижнего ярусов или в проростках злаков, выращенных в разных условиях. Результаты опыта записывают по форме (табл. 30).

30. Определение активности пероксидазы

Ярус	Навеска, г	Объем экстракта, мл	Разведение вытяжки в реакционной смеси	Толщина слоя жидкости в кювете, см	Время изменения окраски раствора, с	Активность пероксидазы, изменение оптической плотности за 1 с на 1 г сырой массы
------	------------	---------------------	--	------------------------------------	-------------------------------------	--

Верхний
Нижний

Материалы и оборудование. Клубни картофеля, 1 %-й раствор гидрохинона, 3 %-й раствор перекиси водорода.

Ножи, терки, марля, воронки, конические колбы на 50 мл, пробирки в штативе, пипетки на 1 и 10 мл.

Растение с листьями нескольких ярусов; проростки пшеницы, ячменя или других культур; клубни картофеля; ацетатный буферный раствор с pH 5,4; раствор бензидина на ацетатном буфере; 0,03 %-й раствор перекиси водорода.

Мерные колбы на 25 мл, пипетки на 2 мл, фарфоровые ступки с пестиком, секундомеры, центрифуга с пробирками, ФЭК.

Приготовление бензидина. В мерную колбу на 200 мл, наполненную на $\frac{2}{3}$ дистиллированной водой прибавляют 2,3 мл (2,4 г) ледяной уксусной кислоты и 184 мл бензидина. Колбу подогревают примерно до 50...60 °C на водяной бане при постоянном

взбалтывании. После полного растворения бензидина (10...15 мин) добавляют 5,45 г ацетата натрия, полностью его растворяют, колбу охлаждают и доливают водой до метки. В темном месте раствор можно хранить семь — десять дней.

Работа 49. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ОРТОДИФЕНОЛОКСИДАЗЫ ПО БОЯРКИНУ

Вводные пояснения. Полифенолоксидаза катализирует окисление ортодифенолов в присутствии кислорода с образованием воды и ортохинонов. Ферментная система окисляет также монофенолы.

Принцип метода определения активности ортодифенолоксидазы тот же, что и для пероксидазы по Бояркину (см. работу 48).

Порядок работы. Растирают в ступке с фосфатным буфером (рН 7,0...7,4) 0,5...1 г растительного материала, переносят в мерную колбу на 25 мл, доводят до метки и центрифугируют в течение 10 мин при интенсивности вращения 3000 мин⁻¹.

Техника определения на ФЭК та же, что и при определении активности пероксидазы. В две кюветы толщиной 2 см вносят по 2 мл вытяжки, 2 мл воды или буферного раствора, 2 мл раствора парафенилендиамина в каждую. Обе кюветы ставят на ФЭК. Уравнивают световые потоки. При этом стрелка гальванометра стоит на нуле. Отсчетный правый барабан переводят на 0,250 деление оптической плотности. Определение ведут при желто-зеленом светофильтре.

В левую кювету вносят 2 мл воды, в правую — 2 мл раствора пирокатехина. Отмечают по секундомеру время от начала приливания пирокатехина до момента, когда стрелка гальванометра достигнет нулевого положения. Подбирают такие разведения вытяжки, при которых время изменения окраски не превышает 30...60 с.

Активность фермента рассчитывают по той же формуле, что и активность пероксидазы. Результаты записывают по следующей форме:

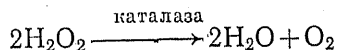
Объект	Навеска материала, г	Объем экстракта, мл	Разведение вытяжки в реакционной смеси	Толщина слоя жидкости в кювете, см	Время изменения окраски раствора, с	Изменение оптической плотности за 1 с на 1 г сырой массы

Материалы и оборудование. Растение с несколькими ярусами листьев, клубни картофеля или другой растительный материал, 1 %-й раствор пирокатехина (готовят перед определением), 0,01... 0,02 %-й раствор парафенилендиамина на 0,01 н. щавелевой кислоте (можно использовать диметилпарафенилендиамина, который растворяют в воде), фосфатный буферный раствор (рН 7...7,5).

Мерные колбы на 25 мл, пипетки на 2 мл, фарфоровые ступки с пестиками, секундомеры, центрифуга с пробирками, ФЭК.

Работа 50. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТАХ

Вводные пояснения. В процессе дыхания в качестве побочного продукта окисления веществ образуется перекись водорода, оказывающая в высоких концентрациях токсичное действие на цитоплазму. Нейтрализация перекиси водорода при участии фермента каталазы идет до воды и молекулярного кислорода по уравнению



Об активности каталазы судят по объему кислорода, выделяющегося в результате разложения перекиси водорода.

Для определения пользуются прибором, который состоит из каталазника 1, бюретки 5 на 50 мл и стеклянной груши 4, соединенных каучуковыми трубками и стеклянным тройником 2. Каучуковая трубка на свободном конце тройника снабжена винтовым зажимом 3. Бюретка и стеклянная груша закреплены в штативе.

Их заполняют дистиллированной водой до половины объема (рис. 20).

Порядок работы. Навеску в 0,5 г листьев растирают в фарфоровой ступке с кварцевым песком и добавляют 0,5 г мела для создания щелочной реакции (рН 7,7

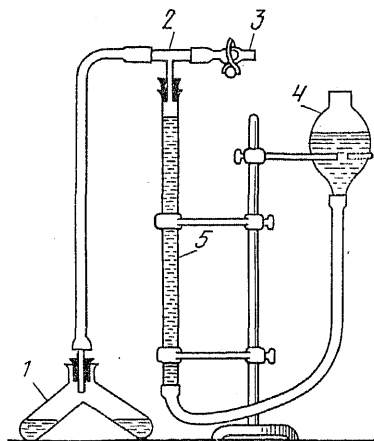


Рис. 20. Прибор для определения активности каталазы:

1 — каталазник; 2 — стеклянный тройник; 3 — винтовой зажим; 4 — стеклянная груша; 5 — бюретка на 50 мл

оптимальна для работы каталазы). Во время растирания вливают небольшими порциями 20 мл воды, смесь вносят в одно колено каталазника. В другое колено помещают 5 мл 3 %-го раствора перекиси водорода. Каталазник соединяют с каучуковой трубкой, не допуская смешивания жидкостей.

Открывают зажим и перемещением воронки устанавливают уровень воды в бюретке на нуль. Закрывают зажим и быстрым изменением положения каталазника смешивают жидкость в обоих коленах. Затем, все время потряхивая каталазник, по снижению уровня воды в бюретке отмечают объем кислорода (в мл), выделенного в течение 3 мин на 1 г массы сырого материала.

Во время опыта каталазник нельзя держать всей ладонью, так как при нагревании от руки воздух в колбе расширяется, что может повлиять на точность отсчета. При отсчете вода в круглой воронке и бюретке должна быть на одном уровне.

Определяют активность каталазы отдельно в листьях верхнего и нижнего ярусов. Можно использовать также проростки различных сортов сельскохозяйственных культур, различающихся по скороспелости и устойчивости к неблагоприятным воздействиям.

Результаты определения активности фермента записывают по форме (табл. 31).

31. Определение активности каталазы

Ярус листьев	Навеска листьев, г	Выделилось О ₂ за 3 мин, мл	Активность каталазы, мл О ₂ на 1 г сырого материала
Верхний	0,5		
Нижний	0,5		

Материалы и оборудование. Растение с листьями нескольких ярусов, проростки пшеницы или другой культуры, промытый речной песок, порошок мела, 3 %-й раствор перекиси водорода.

Фарфоровые ступки с пестиками, пипетки на 5 мл, мерные цилиндры на 25 мл, прибор для определения активности каталазы, песочные часы на 3 мин, весы с разновесами.

**Работа 51. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АСКОРБИНОВОЙ
КИСЛОТЫ, ГЛУТАТИОНА
И ОБЩЕЙ РЕДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ
РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ МЕТОДОМ ПЕТТА
В МОДИФИКАЦИИ ПРОКОШЕВА**

Вводные пояснения. Аскорбиновая кислота — неустойчивое соединение, способное к обратимому окислению и восстановлению, что обусловлено наличием в молекуле двух енольных гидроксильных групп, легко окисляющихся в дикетогруппировку.

Глутатион — трипептид, состоящий из остатков глутаминовой кислоты, цистеина и гликокола. Благодаря сульфгидрильной группе глутатион может подвергаться окислительно-восстановительным превращениям.

Аскорбиновая кислота и глутатион — сильные восстановители и могут восстанавливать $-S-S-$ связи белков, а также функционируют как промежуточные переносчики водорода при окислении некоторых органических кислот в процессе дыхания. Окислительно-восстановительные превращения аскорбиновой кислоты в растениях связаны с ферментативными превращениями окисленного и восстановленного глутатиона. Содержание этих веществ в растительных тканях служит показателем их восстановительной и общей физиологической активности.

Определение содержания аскорбиновой кислоты основано на ее способности восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол. Последний дает два вида реакции. Один обусловлен изменением рН среды: в щелочной среде окраска интенсивно-синяя, в кислой — бледно-красная. Второй вид реакций — восстановительно-окислительный переход от окисленной формы (темно-синяя окраска) в восстановленную (бесцветная). Последнюю реакцию и используют для определения аскорбиновой кислоты. Титруют до появления розового окрашивания, обусловленного избытком индикатора в кислой среде.

Определение содержания глутатиона основано на его способности восстанавливать свободный йод, образующийся при титровании экстракта из растений йодатом калия в кислой среде.

Аскорбиновая кислота, как и глутатион, восстанавливает свободный йод, поэтому титрованием устанавливают суммарную восстановительную активность растительной ткани, которую выражают в миллилитрах

йодата калия. Содержание глутатиона находят, вычитая из данных титрования экстракта йодатом калия данные титрования 2,6-дихлорфенолиндофенолом.

Порядок работы. Помещают в фарфоровую ступку 2 г листьев, растирают с кварцевым песком и с 20 мл 5 %-го раствора метафосфорной кислоты (HPO_3) до состояния однородной кашицы, которую переносят через воронку в мерную колбу на 50 мл, смывая ступку остатком HPO_3 . Содержание колбы доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают и настаивают 5 мин. Затем взбалтывают колбу 2...3 мин и фильтруют содержимое через сухой складчатый фильтр в сухую колбу.

Для определения содержания аскорбиновой кислоты в два бюкса берут по 5 мл фильтрата и титруют из бюретки 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до слабо-розового окрашивания, сохраняющегося в течение 1 мин.

Для определения количества глутатиона и общей редуцирующей активности наливают по 5 мл фильтрата в два других бюкса, добавляют две-три капли 15 %-го раствора KI , пять капель 1 %-го раствора крахмала и титруют из другой бюретки 0,001 н. раствором KIO_3 до слабо-синего окрашивания, сохраняющегося 1 мин.

Содержание аскорбиновой кислоты (A) и глутатиона (Γ), а также редуцирующую активность (P_a) растительной ткани рассчитывают по следующим формулам:

$$A = \frac{(aK) \cdot 0,088 \cdot M \cdot 100}{mn}, \text{ мг \%};$$

$$\Gamma = \frac{(b - aK) \cdot 0,307 \cdot M \cdot 100}{mn}, \text{ мг \%};$$

$$P_a = \frac{bM \cdot 100}{mn}, \text{ мл},$$

где a — количество 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование, мл; b — количество йодата калия, израсходованное на титрование, мл; K — отношение объемов:

$$\frac{\text{йодата калия, мл}}{\text{2,6-дихлорфенолиндофенола, мл}}$$

0,088 — количество восстановленной аскорбиновой кислоты, мл, эквивалентное 1 мл 0,001 н. раствора краски; 0,307 — количество восстановленного глутатиона, мг, эквивалентное 1 мл 0,001 н. раствора йодата калия; n — навеска материала, мг; M — общий объ-

ем экстракта, мл; m — объем экстракта, взятого для титрования, мл.

Для приготовления раствора аскорбиновой кислоты на 2 %-м растворе метафосфорной кислоты в мерную колбу на 50 мл наливают 20 мл 5 %-го раствора HPO_3 , бросают кристаллик аскорбиновой кислоты и доводят жидкость в колбе до метки дистиллированной водой. Оттитровывают 5 мл полученного раствора в двукратной повторности раствором краски и раствором йодата калия, как указано выше, и рассчитывают соотношение объемов.

Содержание аскорбиновой кислоты, глутатиона и общую восстановительную активность определяют в листьях верхнего и нижнего ярусов. В качестве объектов можно использовать также проростки сельскохозяйственных культур, выращенных в разных условиях питания, освещения и влажности.

Результаты опыта записывают по форме (табл. 32).

32. Схема записи результатов опыта

Ярус	Навеска листьев, г	Объем экстракта, мл		Пошло на титрование аскорбиновой кислоты, мл	
		общий	для титрования	краски	KIO_3
1	2	3	4	5	

Верхний
Нижний

Продолжение

Ярус	Отношение объемов KIO_3 краски	Пошло на титрование филтрат, мл		Содержание, мг% массы сырых листьев		Общая редуцирующая активность, мл 0,001 н. KIO_3 на 100 г сырых листьев
		краски	KIO_3	аскорбиновой кислоты	глутатиона	
1	6	7	8	9	10	11

Верхний
Нижний

Материалы и оборудование. Растение с листьями нескольких ярусов, проростки пшеницы или другой культуры, 20 %-й раствор метафосфорной кислоты, 0,001 н. раствор йодата калия, 15 %-й раствор йодида калия, 1 %-й раствор крахмала, 0,001 н. раствор

2,6-дихлорфенолиндифенола, кристаллическая аскорбиновая кислота, кварцевый песок.

Бюретки, пипетки на 10 мл и на 1 мл, мерные колбы на 50 мл, конические колбы на 100 мл, воронки, фильтры, весы с разновесами, мерные цилиндры на 25 мл.

Работа 52. НАБЛЮДЕНИЕ ЗА ДЕЙСТВИЕМ ДИНИТРОФЕНОЛА НА ПОСТУПЛЕНИЕ ВОДЫ В ТКАНЬ КЛУБНЯ КАРТОФЕЛЯ

Вводные пояснения. 2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ) — специфический яд, который, не изменяя или даже усиливая дыхание, разобщает процессы окисления и фосфорилирования в митохондриях. В результате снижается или прекращается новообразование АТФ, что ведет к подавлению процессов, зависящих от энергии дыхания. Нарушается также структура и избирательная проницаемость мембран, для поддержания которой необходима затрата энергии дыхания. Эти изменения приводят к снижению способности клеток поглощать и удерживать воду.

Цель работы — выявить необходимость энергии дыхания для поддержания физиологических функций растительных тканей.

Порядок работы. Из клубня картофеля нарезают ножом десять пластинок длиной и шириной около 1,5 см и толщиной 2...3 мм. Разделяют их на две группы, каждую взвешивают и помещают в бюксы. Одну группу пластинок заливают 15 мл водопроводной воды, другую — 15 мл насыщенного раствора динитрофенола и оставляют в открытых бюксах при комнатной температуре на 1,5...2 ч. Затем пластинки вынимают, просушивают фильтровальной бумагой и снова взвешивают.

Рассчитывают, сколько проникло воды в пластинки в каждом варианте опыта, и на основании полученных

33. Схема записи результатов опыта

Условия	Масса пластинок из ткани клубня, г		Прибавка в массе	
	до опыта	после опыта	в граммах	в процентах исходной массы

Вода
2,4-ДНФ

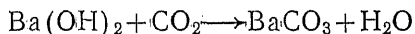
результатов делают выводы о влиянии динитрофенола на поступление воды в ткань клубня картофеля. Результаты опыта записывают по форме (табл. 33).

Материалы и оборудование. Клубни картофеля, раствор динитрофенола (насыщенный).

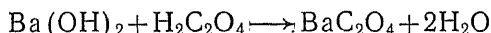
Бюксы, ножи, весы с разновесами, стеклянные пластинки, фильтровальная бумага.

Работа 53. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ДЫХАНИЯ СЕМЯН В ЗАКРЫТОМ СОСУДЕ

Вводные пояснения. Метод заключается в учете количества CO_2 , выделяемого семенами при дыхании. Процесс поглощения диоксида углерода баритом можно записать в виде следующего уравнения:



Избыток барита, не прореагировавшего с CO_2 , оттитровывают щавелевой кислотой:



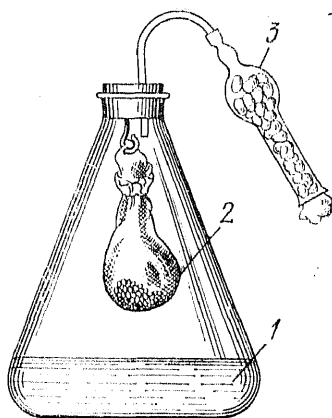
Порядок работы. В марлевый мешочек помещают 4 г проросших семян пшеницы. В две конические колбы наливают при помощи бюретки по 10 мл 0,1 н. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и закрывают колбы пробками*. В одну колбу, приоткрыв ее, быстро подвешивают на крючок пробки мешочек с семенами (рис. 21), другую колбу оставляют в качестве контроля. Выдерживают обе колбы 1 ч при комнатной температуре (20°C).

В течение опыта периодически осторожно покачивают колбы, чтобы разрушить пленку BaCO_3 , образующуюся на поверхности барита и препятствующую полноте поглощения CO_2 . Затем вынимают из колбы мешочек с семенами, добавляют три капли фенолфталеина и оттитровывают барит 0,1 н. щавелевой кислотой до слабо-розового окрашивания, исчезающего от одной капли кислоты. Так же оттитровывают барит в контрольной колбе. При титровании колбы закрывают пробкой, через которую проходит кончик пипетки, присоединенный к бутылке с баритом.

* Барит ядовит! Его нельзя оставлять открытым, так как он легко поглощает CO_2 из воздуха.

Рис. 21. Колба для определения интенсивности дыхания семян:

1 — раствор барита; 2 — марлевый мешочек; 3 — поглотитель с натронной известью



Интенсивность дыхания, мг CO_2 на 1 г сухих семян за 1 ч, рассчитывают по формуле

$$J = \frac{(a-b)K \cdot 2,2}{n}$$

где a и b — количества 0,1 н. щавелевой кислоты, израсходованной на титрование барита соответственно в контрольном и опытном вариантах, мл; K — поправка к титру 0,1 н. раствора щавелевой кислоты; 2,2 — количество CO_2 , мг, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора щавелевой кислоты; n — масса сухих семян, г.

Параллельно определяют дыхание семян при 30 °С. Результаты опыта записывают по форме (табл. 34).

34. Определение интенсивности дыхания

Температура, °С	Навеска семян, г	Влажность семян, г	Масса сухих семян, г	Объем барита, мл	Количество щавелевой кислоты, прошедшей на титрование, мл		Интенсивность дыхания, мг CO_2 на 1 г сухих семян за 1 ч
					контроль	опыт	

20
30

Материалы и оборудование. Прорастающие семена пшеницы, 0,1 н. раствор барита, 0,1 н. раствор щавелевой кислоты, 1 %-й раствор фенолфталеина.

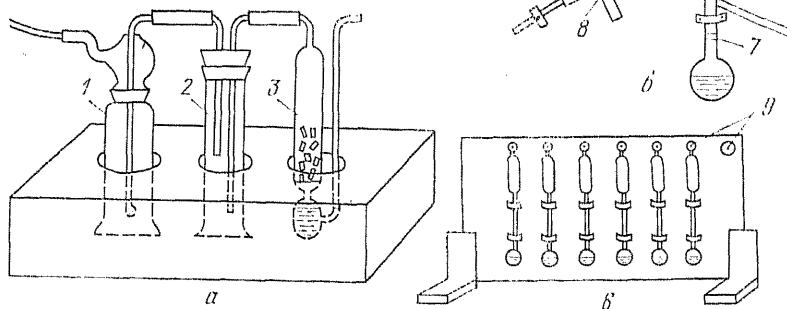
Весы с разновесами, конические колбы на 250 мл с пробками, снабженными трубкой с натронной известью, марлевые мешочки.

Работа 54. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ДЫХАНИЯ ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН В ТОКЕ ВОЗДУХА

Вводные пояснения. Метод основан на учете количества диоксида углерода, выделяемого семенами при дыхании. Семена помещают в приемник, через который просасывают воздух, прошедший через поглотитель CO_2 .

Рис. 22. Установка для количественного учета выделенного при дыхании диоксида углерода:

а — деревянный штатив с приборами первого набора: 1 — поглотитель для связывания CO_2 , выделенного семенами; 2 — приемник для семян; 3 — поглотитель для связывания CO_2 воздуха; 4 — схема соединения приборов второго набора: 4 — резиновая трубка, соединяющая ресивер с компрессором; 5 — винтовой зажим (общий кран); 6 — реометр; 7 — лента на реометре; 8 — ресивер; 9 — штатив с реометрами; 9 — регулировочные винты



Порядок работы. Собирают установку для определения интенсивности дыхания, включающую два набора приборов. Первый набор, вмонтированный в деревянный штатив, включает приемник для семян (стеклянная банка с пробкой, снабженная двумя отводными трубками); поглотитель для связывания атмосферного диоксида углерода (трубка Бабо); поглотитель CO_2 , выделяемого семенами (склянка Дрекслея), длинная отводная трубка которого оканчивается стеклянным фильтром (рис. 22, *а*). Вторым набором включает реометр (прибор для регулирования скорости тока воздуха) и присоединяется через ресивер к воздушному компрессору, служащему для просасывания воздуха через систему приборов (см. рис. 22, *б*). Ресивер позволяет одновременно включать несколько комплектов приборов, число которых определяется числом вариантов в опыте. Реометры укрепляют на деревянной подставке (см. рис. 22, *в*).

В один приемник помещают 25 г прорастающих семян пшеницы, другой оставляют в качестве контроля. Приемник при помощи резиновой трубки соединяют

длинной отводной трубкой через ресивер с реометром и компрессором. В поглотители CO_2 наливают по 75 мл 0,1 н. раствора барита, отмерив его мерным цилиндром, снабженным пробкой.

Открывают винтовой зажим ресивера и реометра. Включают компрессор. В течение 10 мин просасывают воздух через систему приборов. При помощи винтового зажима на каучуковой трубке, соединяющей реометр с ресивером, регулируют скорость тока воздуха так, чтобы уровень жидкости в реометре доходил до отметки, установленной на трубке реометра. Предварительно реометры должны быть откалиброваны таким образом, чтобы скорость тока воздуха составляла 10 л/ч.

Включают в систему приборов поглотители CO_2 , соединяя их длинной трубкой с приемником для семян, а короткой — с ресивером, и просасывают воздух для учета CO_2 , выделенного семенами. Через 30 мин просасывание прекращают и дают отстояться осадку бикарбоната бария в поглотителях. Затем из каждого поглотителя берут пипеткой две порции по 25 мл барита в колбы для титрования, вносят три капли фенолфталеина и титруют 0,1 н. щавелевой кислотой до слабо-розового окрашивания, исчезающего от одной капли кислоты. Интенсивность дыхания (в мг CO_2 , выделяемого 1 г сухих семян за 1 ч) рассчитывают по формуле

$$J = \frac{(a-b)K \cdot 2,2 \cdot M \cdot 60}{mnt}$$

где M — общий объем раствора барита в поглотителе, мл; m — объем раствора барита, взятый для титрования, мл; t — продолжительность опыта. Остальные обозначения приведены в работе 53.

Результаты опыта записывают по схеме, указанной в предыдущей работе.

Материалы и оборудование. Проросшие семена пшеницы, 0,1 н. раствор барита, 0,1 н. раствор щавелевой кислоты, 1 %-й раствор фенолфталеина.

Весы с разновесами, поглотители (склянки Дрекселя), реометры, мерные цилиндры с пробками, конические колбы на 100 мл с пробками, пипетки на 25 мл, приемники для семян, трубки Бабо с 20 %-м раствором КОН, ресивер, деревянный штатив для приборов, деревянная подставка для реометров, воздушный компрессор.

Работа 55. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЫХАТЕЛЬНОГО КОЭФФИЦИЕНТА ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН

Вводные пояснения. Важный показатель химической природы дыхательного субстрата — дыхательный коэф-

фициент (ДК), т. е. отношение объема выделенного диоксида углерода (V_{CO_2}) к объему поглощенного кислорода (V_{O_2}). При окислении углеводов дыхательный коэффициент равен 1, при окислении жиров (более восстановленных соединений) кислорода поглощается больше, чем выделяется диоксида углерода и $ДК < 1$. При окислении органических кислот (менее восстановленных, чем углеводы соединений) $ДК > 1$.

Величина ДК зависит и от других причин. В некоторых тканях из-за затрудненного доступа кислорода наряду с аэробным происходит анаэробное дыхание, не сопровождающееся поглощением кислорода, что приводит к повышению значения ДК. Величина коэффициента обусловлена также полнотой окисления дыхательного субстрата. Если, кроме конечных продуктов, в тканях накапливаются менее окисленные соединения (органические кислоты), то $ДК < 1$.

Прибор для определения дыхательного коэффициента состоит из большой пробирки с плотно пригнанной каучуковой пробкой, в которую вставлена изогнутая под прямым углом измерительная трубка со шкалой из миллиметровой бумаги.

Порядок работы. Половину пробирки заполняют прорастающими семенами подсолнечника. Плотно закрывают пробирку каучуковой пробкой с измерительной трубкой и вводят в конец этой трубки при помощи пипетки небольшую каплю воды, создавая таким образом внутри прибора замкнутую атмосферу. Во время опыта обязательно поддерживают постоянную температуру. Для этого ставят прибор в штатив или колбу и не нагревают руками или дыханием. Измеряют, на сколько делений шкалы продвинется капля внутри трубки за 2 мин. Для получения точного результата вычисляют среднюю величину из нескольких отсчетов. Полученная величина (A) выражает разницу между объемом поглощенного при дыхании кислорода и объемом выделенного диоксида углерода.

Открывают пробирку с семенами и вкладывают в нее пинцетом свернутую в кольцо полоску фильтровальной бумаги, смоченную 20 %-м раствором едкого натра. Снова закрывают пробирку, помещают в измерительную трубку новую каплю воды и продолжают измерение скорости ее движения при той же температуре. Новые данные, из которых опять вычисляют среднюю

величину за тот же период, выражают объем поглощенного при дыхании кислорода (B), так как выделенный диоксид углерода поглощается щелочью. Дыхательный коэффициент будет равен

$$V_{\text{CO}_2}/V_{\text{O}_2} = (B - A)/B.$$

Результаты опыта записывают по форме (табл. 35).

35. Определение дыхательного коэффициента

Условия	Отсчеты, мм за 2 мин				$\left(\frac{B-A}{B}\right)$
	1	2	3	среднее	

Без щелочи (A)

Со щелочью (B)

Материалы и оборудование. Прорастающие семена подсолнечника, 20 %-й раствор едкого натра.

Прибор для определения дыхательного коэффициента, пинцеты, полоски фильтровальной бумаги, песочные часы на 2 мин, стеклянные чашки, пипетки, стеклянные палочки, конические колбы на 250 мл.

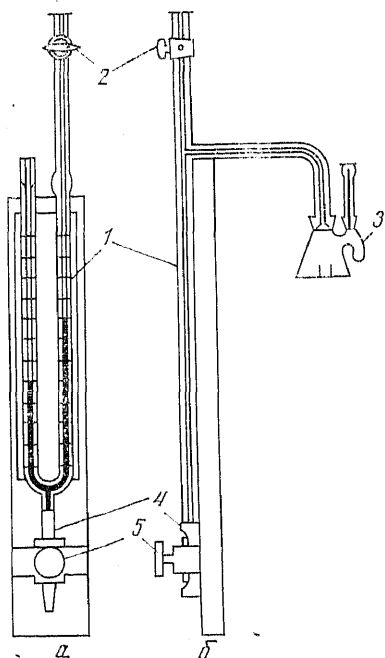
Работа 36. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ДЫХАНИЯ И ДЫХАТЕЛЬНОГО КОЭФФИЦИЕНТА ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА ВАРБУРГА

Вводные пояснения. Для изучения дыхательного и фотосинтетического газообмена широко используют манометрический метод Варбурга. Преимущества метода: высокая чувствительность, что позволяет работать с малыми навесками опытного материала; возможность наблюдать за динамикой газообмена и одновременно учитывать газообмен O_2 и CO_2 , что позволяет установить дыхательный коэффициент.

Метод основан на определении количества выделенного или поглощенного объектом газа по изменению давления в замкнутой системе при постоянных объеме и температуре. Давление определяют при помощи чувствительного манометра. Главное условие применения метода для изучения газообмена с участием двух газов (дыхание, фотосинтез) — регистрация изменений давления одного газа. Парциальное давление другого газа искусственно приводят к нулю или поддерживают на постоянном уровне. Интенсивность дыхания обычно

Рис. 23. Сосудик с манометром (а — вид спереди, б — вид сбоку):

1 — манометр; 2 — двухходовой кран; 3 — сосудик; 4 — отрезок резиновой трубки для жидкости Броди; 5 — винтовой зажим



определяют по изменению давления в результате поглощения объектом кислорода. При этом диоксид углерода поглощается щелочью.

Прибор Варбурга состоит из набора манометров с сосудиками, в которые помещают исследуемый материал (рис. 23); ванны с нагревателем, терморегулятором и мешалкой; приспособления для встряхивания сосудиков с манометрами. Форма и объем сосудиков в

зависимости от задач исследования и условий работы могут быть различными (10...15 мл). Внутри сосудика в дно вделан небольшой стаканчик, в который вносят щелочь.

Манометр представляет U-образную капиллярную трубку с внутренним диаметром 0,8...1 мм. Оба колена манометра с нанесенными на них делениями от 0 до 300 мм соединяются внизу в одну трубку, на которую надевают отрезок резиновой трубки 4, закрытой стеклянной палочкой.

Правое колено манометра имеет боковой отросток со шлифом для соединения с сосудиком. На выступы сосудика и манометра надевают резиновые кольца, поддерживающие сосудик. Левое колено манометра заканчивается сверху небольшим, всегда открытым расширением.

Порядок работы. Оба колена манометра, а также резиновую трубку заполняют жидкостью Броди, уровень которой в коленах можно менять при помощи вин-

тового зажима, находящегося на каучуковой трубке внизу манометра.

Приготовление жидкости Броди. Растворяют 2,3 г хлорида натрия и 0,5 г холената натрия в дистиллированной воде, объем доводят до 50 мл. Для предохранения от загнивания к раствору добавляют несколько капель концентрированного спиртового раствора тимола.

Для окраски в жидкость Броди добавляют флуоресцеин или кислый фуксин. Плотность жидкости Броди 1,033. Давление столбика жидкости Броди высотой 10 000 мм (P_0) равно 1 атм (101,3 кПа). Это следует из уравнения

$$P_0 = \frac{760 \cdot 13,6}{1,033} = 10\,000,$$

где 13,6 — плотность ртути.

Все отсчеты делают по уровню жидкости Броди в левом открытом колене после того, как объем опытного пространства в правом колене манометра предварительно доведен до постоянной величины, т. е. уровень жидкости в правом колене установлен на 150 мм или на другую отметку, принятую за «0». Этим достигается постоянство объема газового пространства, которое складывается из объемов сосудика и части замкнутого жидкостью Броди правого колена манометра. Манометры с пришлифованными к ним сосудиками укрепляют на деревянной или металлической подставке и вставляют в приспособление для качания, которое смонтировано на стенках термостатной ванны. Сосудики погружают в ванну, а манометры закрепляют снаружи.

Сосудики при качании должны быть целиком погружены в воду. Число качаний — 80...120 в 1 мин, амплитуда колебаний сосудиков — 3...5 см. Качание необходимо для того, чтобы обеспечить быстрый газообмен между жидкой и газовой фазами в сосудиках. Термостатную ванну заполняют водой, уровень которой должен быть примерно на 3 см ниже уровня ванны. В течение всего опыта в ванне поддерживают постоянную температуру (колебания не более 0,02...0,03 °C).

Определение константы сосудика. Константа сосудика (K) характеризует объем газа, который вызывает смещение жидкости Броди в манометре на 1 мм. Зная K сосудика и отмечаемое по манометру из-

менение давления (H , в мм манометрической жидкости с поправкой на показания термобарометра), можно вычислить объем поглощенного или выделенного газа X по формуле

$$X = HK.$$

Чтобы рассчитать константы, необходимо знать объем (V_1) опытных сосудов, включая объем капиллярной трубки манометра до деления в правом колене, принятого за нуль. Для этого сосудики калибруют, предварительно вместе с манометрами тщательно промыв (свежеприготовленной хромовой смесью, водопроводной и дистиллированной водой, спиртом), и высушивают. Если сосудики загрязнены смазкой, ее удаляют сначала ватой или бумагой, смоченной бензином, после чего промывают водой, а затем хромовой смесью. Так же тщательно промывают сосудики после каждого опыта.

Калибрование осуществляют дистиллированной водой. Для этого берут высокий сосуд с водой комнатной температуры. Наполняют сосудик водой так, чтобы на стенках не было пузырьков воздуха. Шлиф бокового отростка манометра погружают в воду, через конец манометра над краном подсасывают воду до крана, надевают под водой сосудик на манометр и закрывают кран манометра. Чтобы заполнить правую ветвь манометра водой, нижний конец манометра опускают в воду и через конец манометра над краном при открытом кране насасывают воду.

Вынув манометр из воды и обтерев его нижний конец, подсасывают воду так, чтобы вода заполнила верхнюю часть правой ветви манометра до деления «150». И манометр, и сосудик обтирают снаружи и взвешивают с точностью до 0,01 г, так же взвешивают пустой сухой сосудик с манометром. По разности между первым и вторым взвешиванием находят массу воды. Зная температуру воды по плотности (табл. 36), рассчитывают ее объем, а следовательно, объем опытного пространства. При повторных определениях массы одного и того же сосудика погрешность определения не должна превышать 0,2 %.

Более точный, но и более трудоемкий способ определения константы сосудика — калибрование ртутью.

Расчет константы. Во время опыта в сосудике находятся газ и жидкость. При этом некоторое коли-

36. Удельный объем воды (объем 1 г воды в мл) в зависимости от температуры

Температура, °С	Удельный объем, г/мл	Температура, °С	Удельный объем, г/мл
15	1,00087	23	1,00244
16	1,00103	24	1,00268
17	1,00120	25	1,00294
18	1,00138	26	1,00320
19	1,00157	27	1,00347
20	1,00177	28	1,00375
21	1,00198	29	1,00405
22	1,00221	30	1,00435

чество газа растворяется в жидкости, обуславливающей определенное давление своих паров (R) в газовой фазе.

Общее количество газа, которое имеется в сосудике в начале опыта, складывается из находящегося в газовой фазе и растворенного в жидкости. В газовой фазе при температуре T и давлении ($P-R$) газ занимает объем V_g . На основании уравнения

$$PV/T = P_1 V_1 / T_1$$

можно привести этот объем газа к стандартным условиям. Обозначим индексом «1» стандартные условия, т. е. $P_1 = P_0 = 101,3$ кПа, $T_1 = 273$ °К = 0 °С, V_1 — это объем газа при стандартных условиях. Тогда

$$\frac{(P-R) V_g}{T} = \frac{P_0 V_1}{273},$$

откуда

$$V_1 = \frac{V_g (P-R) 273}{P_0 T}.$$

В жидкой фазе газ занимает объем

$$\frac{V_f \alpha (P-R)}{P_0}.$$

Общее количество газа в начале опыта

$$\frac{V_g (P-R) 273}{P_0 T} + \frac{V_f \alpha (P-R)}{P_0} = \frac{P-R}{P_0} \left(V_g \frac{273}{T} + V_f \alpha \right),$$

где V_g — объем газового пространства опытного сосудика, включая часть манометра до нулевой отметки (равен исходному объему V_1 , определенному калиброванием, за вычетом V_f), мл; V_f — объем жидкости, налитой в сосудик, мл; T — температура опыта в градусах абсолютной шкалы (273 °К); α — растворимость газа, мл

(коэффициент Бунзена) на 1 мл жидкости (при парциальном давлении газа 101,3 кПа и температуре T); P_0 — давление одной атмосферы (101,3 кПа), равное давлению столба жидкости Броди в 10 000 мм.

В конце опыта количество газа изменяется на некоторую величину X , что вызывает смещение мениска жидкости в манометре на H мм. Если газ поглощается, то H имеет отрицательное значение, если газ выделяется — положительное (в первом случае конечное давление газа равно $P-R-H$).

При поглощении газа его количество в газовой фазе в конце опыта равно

$$\frac{V_g (P-R-H) 273}{P_0 T},$$

в жидкой фазе

$$\frac{V_l \alpha (P-R-H)}{P_0}.$$

Общее количество газа к концу опыта составляет

$$\frac{V_g (P-R-H) 273}{P_0 T} + \frac{V_l \alpha (P-R-H)}{P_0} = - \frac{P-R-H}{P_0} \cdot \times \left(V_g \frac{273}{T} + V_l \alpha \right).$$

Количество потребленного газа (X) равно начальному количеству за вычетом конечного количества газа:

$$X = \frac{P-R}{P_0} \left(V_g \frac{273}{T} + V_l \alpha \right) - \frac{P-R-H}{P_0} \cdot \left(V_g \frac{273}{T} + V_l \alpha \right) = H \left[\frac{V_g \frac{273}{T} + V_l \alpha}{P_0} \right] = HK.$$

Величина в квадратных скобках — константа сосуда (K). Величина K , как видно из формулы, не постоянна для данного сосуда в разных условиях, а зависит от коэффициента растворимости газа α и вида газа. При определении одного и того же газообразного вещества константа постоянна только в определенных условиях опыта, так как зависит от температуры (T) и от объема жидкости в сосудике (V_l). При изменении этих условий константа меняется, и ее необходимо вычислять заново.

37. Коэффициенты растворимости газа в зависимости от температуры (1 мл газа в 1 мл воды при давлении 1 атм)

Температура, °C	O ₂	CO ₂	Температура, °C	O ₂	CO ₂
15	0,03441	1,019	25	0,02822	0,759
20	0,03091	0,878	30	0,02612	0,665

Значения α для CO₂ и O₂ при разной температуре даны в таблице 37.

Пример расчета K. Объем сосуда — 23,05 мл. Температура опыта — 25 °C (298 °K), V_t — объем жидкости, налитой в сосудик, — 2 мл. Навеска растительной ткани — 0,32 г (приблизительно принимают, что плотность ткани равна 1, т. е. 1 г ткани занимает объем 1 мл); α — коэффициент растворимости кислорода в воде при 25 °C — составляет 0,028 (см. табл. 37).

V_g — рабочий объем сосуда равен 23,05—2—0,32=20,73 мл. Выражаем объем в микролитрах и подставляем значение в формулу константы:

$$K = \frac{20\,730 \cdot \frac{273}{298} + 2000 \cdot 0,028}{10\,000} = 1,955.$$

Таким образом, чем меньше объем воздушной фазы сосуда, тем меньше константа и тем больше чувствительность прибора.

Заполнение манометров жидкостью Броди. Тщательно промытые и высушенные после калибрования манометры заполняют манометрической жидкостью и закрепляют на подставке. Для этого прокипяченные и высушенные отрезки резиновой трубки длиной по 10...15 см подходящего к манометру диаметра закрывают с одного конца стеклянной пробкой, а через открытый конец заполняют манометрической жидкостью, не доводя ее до края на 0,5 см. Немного надавив резиновую трубку так, чтобы жидкость образовала выпуклый мениск над трубкой, надевают трубку на соответствующий конец манометра. В жидкости (как в трубке, так и в манометре) не должно быть пузырьков воздуха. Заполненный манометр закрепляют на подставке. Поворотом винтового зажима поднимают манометрическую жидкость в обоих коленях манометра до 150 мм.

Если в манометрической жидкости образовались пузырьки воздуха, их удаляют. Для этого быстро надав-

ливают и опускают резиновый резервуар или подводят манометрическую жидкость (при закрытом кране и надетом сосудике) в расширение левого открытого колена, где пузырьки можно удалить иглой.

Установление термобарометров. Одновременно с опытными в термостатную ванну помещают контрольные сосудики — так называемые термобарометры, по которым контролируют возможные колебания температуры и внешнего давления. В качестве термобарометра применяют обычный манометр, соединенный с сосудиком, в который наливают тот же раствор, что и в опытные сосудики. В каждом опыте ставят один-два термобарометра (или больше). При определении показаний опытных манометров вводят поправку на термобарометр.

Если уровень жидкости в открытом колене термобарометра поднялся, это указывает или на уменьшение внешнего давления, или на повышение температуры ванны. Если при этом в опытных сосудиках давление уменьшилось, то к показанию опытного манометра нужно прибавить показание термобарометра. Если же уровень манометрической жидкости в опытных сосудиках повысился, из показаний опытного сосудика вычитают показания термобарометра. Таким образом, если показания опытного манометра и термобарометра имеют разные знаки, то показания складывают, если знаки одинаковы — вычитают (табл. 38).

38. Пример расчета

Показания		С поправкой на термо- барометр	Показания		С поправкой на термо- барометр
спыт	термо- барометр		опыт	термо- барометр	
-2,0	-0,2	-1,8	+1,0	-0,2	+1,2
-2,0	+0,2	-2,2	+1,5	+0,2	+1,3

Схема опыта. Во внутренний стаканчик сосудика наливают 0,3...0,5 мл 20 %-го раствора КОН. При расчетах константы сосудика количество добавленной щелочи должно быть включено в объем палитой в сосудик жидкости V_f . Для увеличения поверхности, поглощающей CO_2 , в стаканчик со щелочью вставляют пинцетом кусочек фильтровальной бумаги так, чтобы она выступала над краем на 3...5 мм. После увлажнения

ния бумажки на дне стаканчика должно оставаться некоторое количество щелочи.

В опытный сосудик помещают навеску растительного материала (300...500 мг). При работе с листьями из них сверлом вырезают диски диаметром 0,5...0,7 см или разрезают листья на кусочки. При работе с корешками или водными растениями навеску помещают в жидкость, состав которой зависит от схемы опыта.

Сосудики надевают на заранее смазанные шлифы манометров и тщательно притирают. Хорошо притертые шлифы прозрачны. Сосудики закрепляют резиновыми кольцами. Манометры с сосудиками ставят в предварительно нагретую до нужной температуры термостатную ванну. Краны манометров должны быть открыты. Включают систему качания.

В течение 20...30 мин выполняют качание при открытом кране правого колена манометра. Затем, остановив качание, устанавливают уровень манометрической жидкости в правом колене на делении «150» мм, закрывают кран и отмечают положение мениска в левом колене манометра (в некоторых манометрах деления в левом и правом коленах не совпадают). Снова включают качание. Отмечают время начала опыта. Отсчеты по манометру снимают каждые 20...30 мин и более в зависимости от схемы опыта.

Для того чтобы снять отсчет, отключают качание, уровень жидкости в правом колене снова доводят до деления «150» мм и отмечают положение мениска в левом колене. Определяют величину смещения жидкости (H) за опытное время, вводят соответствующую поправку на показания термобарометров, умножают полученное значение на константу сосудика и получают количество поглощенного кислорода в объемных единицах. Для расчета интенсивности дыхания (количества поглощенного кислорода в микролитрах на 1 г сырой массы за 1 ч) выполняют не менее двух определений.

После окончания опыта открывают краны манометров и только после этого снимают манометры с сосудиками с ванны и ставят их на специальные штативы. Если снять манометр, не открыв кран, то из-за быстрого понижения температуры манометрическая жидкость может быть переброшена в сосудик.

Манометрическим методом можно одновременно определять и поглощение кислорода и выделение диокси-

да углерода, что позволяет рассчитать дыхательный коэффициент. Параллельно осуществляют два определения. В центральный стаканчик одного сосудика наливают щелочь и определяют поглощение кислорода, в стаканчик другого — воду и определяют разницу объемов поглощенного кислорода и выделенного диоксида углерода.

Изменение давления газа в сосудике, вызванное потреблением кислорода при дыхании, выражается уравнением: $H_{O_2} = X_{O_2} : K_{O_2}$; изменение давления газа, вызванное выделением диоксида углерода, — уравнением: $H_{CO_2} = X_{CO_2} : K_{CO_2}$.

Фактически наблюдаемое изменение давления во втором сосудике (с водой) равно сумме парциальных давлений двух газов:

$$H = H_{O_2} + H_{CO_2} = \frac{X_{O_2}}{K_{O_2}} + \frac{X_{CO_2}}{K_{CO_2}}, \quad (1)$$

отсюда

$$X_{CO_2} = \left(H - \frac{X_{O_2}}{K_{O_2}} \right) K_{CO_2}; \quad (2)$$

где K_{CO_2} — константа сосудика по диоксиду углерода (вычисляют по указанной выше формуле, в которую подставляют значение α для данного газа, см. табл. 37).

Пример расчета. Константа первого сосудика по кислороду 0,95, второго 1,05. Константа этого же сосудика по диоксиду углерода равна 1,25. Изменение давления в первом сосудике (H_{O_2}) равно —26 мкл, во втором (H_{CO_2}) — 9,0.

Объем поглощенного кислорода в первом сосудике равен $-26 \cdot 0,95 = -24,70$ мкл. Объем диоксида углерода во втором сосудике:

$$X_{CO_2} = \left(-9,0 - \frac{-24,7}{1,05} \right) \cdot 1,25 = 18,10 \text{ мкл.}$$

Дыхательный коэффициент составляет $18,10 : 24,70 = 0,73$.

Определение ДК можно вести последовательно в одном сосудике. Сначала определяют разницу объемов кислорода и диоксида углерода, наливая в центральный стаканчик сосудика воду, затем в этом же сосудике, отсосав пипеткой воду и налив раствор щелочи, определяют количество поглощенного кислорода. Расчеты ведут по формуле (2). Результаты опытов по определению количества поглощенного O_2 (или выделенного CO_2) записывают по форме (табл. 39).

39. Схема записи результатов опыта

Вариант	Номер сосулика	Навеска, г	Время отсчета	Показание опытного манометра; мм	Показание термобарометра, мм	H (с поправкой на термобарометры), мм	X=HK	X за время опыта	Поглощено O ₂ , мл, за 1 ч на 1 г сухой массы	Данные для расчета константы сосулика		
										α	$V_{\text{ст}}$	V_f

Материалы и оборудование. Листья растений пшеницы, бобов, гороха, люпина, прорастающие семена и корни проростков пшеницы, 20 %-й раствор КОН, замазка для шлифов манометров, дистиллированная вода, хлорид натрия, холеновоокислый натрий.

Стеклянные сосуды, простые и градуированные пипетки на 1..2 мл, фильтровальная бумага, пинцеты, ножницы, пробочные сверла, резиновые подкладки, прибор Варбурга, торзионные весы, технические весы.

Приготовление замазки для шлифов. Готовят смесь воска, парафина и вазелина в соотношении 1 : 2 : 3. Смесь помещают в фарфоровую чашку или стакан, расплавляют на водяной бане и нагревают 8..10 мин.

Глава 6

МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ

Физиология минерального питания включает исследование значения структурных особенностей тканей и отдельных клеток проводящей системы корня, стебля и листа, обеспечивающих поток ионов и молекул в отдельную клетку и весь растительный организм; движущих сил ионного и молекулярного транспорта, его регуляции на основе знаний физиологии и биохимии проводящих систем растения. Важный раздел физиологии минерального питания занимается изучением зависимостей между потоком питательных веществ, климатическими и почвенными факторами.

В состав растений входят почти все известные элементы, однако многие из них не относят к необходимым и незаменимым. Элемент считается необходимым, если: его отсутствие исключает нормальный жизненный цикл растения; недостаток — вызывает специфические нарушения жизнедеятельности растений, предотвращаемые или устраняемые внесением данного элемента; он непосредственно участвует в процессах превращения веществ и энергии.

К необходимым для высших зеленых растений элементам (кроме углерода, водорода и кислорода) относят *макроэлементы* — азот, фосфор, серу, калий, кальций и магний; *микроэлементы* — железо, марганец, медь, цинк, бор, молибден, кобальт.

При помощи корней растения поглощают макро- и микроэлементы из почвенного раствора в виде соответствующих ионов. Ионы минеральных веществ концентрируются в тканях растений в характерных для каждого семейства, рода или вида количествах и соотношениях. Например, соотношение между калием и кальцием характеризует принадлежность растений к тому или другому типу калий-кальциевого питания.

Действительные потребности растений в минеральных элементах можно установить только при выращивании их на искусственных питательных средах (водные и песчаные культуры). Для этого используют: дистиллированную воду и химически чистые кварцевый песок, соли; химически стойкие сосуды и посуду для приготовления и хранения растворов.

Опыты проводят в специальных сооружениях — *вегетационных домиках*. В холодное время года домики оборудуют отопительными устройствами (такие домики называют теплицами или оранжереями). В последнее время для выращивания растений используют искусственные источники света: обычные лампы накаливания, ксеноновые лампы и др. Сооружения, в которых можно регулировать все факторы роста и развития растений, называются *лабораториями*, или *станциями*, *искусственного климата*, а наиболее хорошо оборудованные из них — *фитотронами*.

Для выращивания растений в водных и песчаных культурах используют смеси солей, содержащие все необходимые макро- и микроэлементы. В почвенных культурах вносят только соли недостающих элементов.

Поскольку одни элементы растения усваивают в виде катионов, а другие — в виде анионов, то можно подобрать такие соли, в которых необходимые элементы находятся и в катионной, и в анионной части. Чаще всего применяют нитрат кальция $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$, нитрат калия (KNO_3) , нитрат аммония (NH_4NO_3) , однозамещенный фосфат калия (KH_2PO_4) , двухзамещенный фосфат калия (для песчаных культур, CaHPO_4), сульфат калия

(K_2SO_4), сульфат магния ($MgSO_4$). Каждая из этих солей содержит два необходимых элемента.

Для создания требуемых соотношений между элементами приходится вводить и соли, содержащие только один необходимый элемент (например, KCl). В питательные смеси включают наиболее удобные и стойкие соли микроэлементов. Больше всего растениям требуется железо (5...10 мг/л), которое дают в виде хлорида ($FeCl_2$) или сульфата железа [$Fe_2(SO_4)_3$]. Чтобы избежать выпадения в осадок фосфата или гидроксида железа и хлороза растений при нейтральной и слабощелочной реакции питательного раствора, применяют цитрат (лимоннокислый) или тарترات (виннокислый) железа, а в последнее время — хелат железа с этилендиаминтетрауксусной кислотой.

Марганец, медь и цинк вносят в виде солей серной или соляной кислот, молибден — в виде натриевой или аммонийной солей молибденовой кислоты (H_2MoO_4), бор — в виде борной кислоты (H_3BO_3). Концентрация марганца и бора в смеси обычно составляет 0,1...1 мг/л, меди, цинка и молибдена — 0,01...0,10 мг/л.

В справочниках по физиологии растений и агрохимии приводят составы многих питательных смесей. Наиболее часто употребляют смеси Кнопа, Гельригеля, Прянишникова, Хогланда — Снайдерса.

Смесь Хогланда — Снайдерса — наиболее эффективна и относительно проста по составу (табл. 40). Суммарная концентрация макроэлементов в этой смеси составляет примерно 2000 мг/л, или 0,2 %, в водной культуре; в песчаной она в пять-шесть раз выше, поскольку даже при полной влагоемкости песка количество добавляемой воды составляет примерно 250 г на 1 кг песка.

Каждая питательная смесь должна не только содержать все необходимые для растения элементы в нужных количествах и соотношениях, но и быть оптимальной по концентрации водородных ионов. Для большинства растений оптимальный рН 5,5...7,8. Начальная концентрация ионов водорода в растворе зависит от химической и гидролитической кислотности или щелочности солей и от их буферной способности, а изменение рН в процессе питания растений — от физиологической кислотности или щелочности солей.

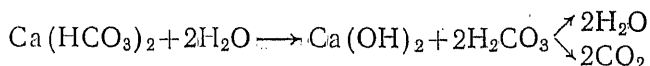
Начальная кислотность питательной смеси Хогланда — Снайдерса 5,5...5,6, так как KH_2PO_4 — химически

40. Полная питательная смесь Хогланда—Снайдерса и с исключением N, P и K

Соли или ионы	Полная			Без N			Без P			Без K		
	г/л	г-моль/л	мг/л	мг-экв. л-1	г/л	г-моль/л	мг/л	мг-экв. л-1	г/л	г-моль/л	мг/л	мг-экв. л-1
KNO ₃	0,51	0,005	—	—	—	—	0,51	0,005	—	—	—	—
Ca(NO ₃) ₂ б/в*	0,82	0,005	—	—	—	—	0,82	0,005	0,82	0,005	—	—
KH ₂ PO ₄	0,136	0,001	—	—	0,136	0,001	—	—	—	—	—	—
MgSO ₄ ·H ₂ O	0,49	0,002	—	—	0,49	0,002	0,49	0,002	0,49	0,002	—	—
KCl	—	—	—	—	0,38	0,005	0,07	0,001	—	—	—	—
NaNO ₃	—	—	—	—	—	—	—	—	0,42	0,005	—	—
NaH ₂ PO ₄	—	—	—	—	—	—	—	—	0,138	0,001	—	—
CaSO ₄ ·2H ₂ O	—	—	—	—	0,86	0,005	—	—	—	—	—	—
K ⁺	—	—	234	6	—	—	234	6	—	—	—	—
Na ⁺	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	138	8
Ca ²⁺	—	—	200	10	—	—	200	10	—	—	200	10
Mg ²⁺	—	—	48	4	—	—	48	4	—	—	48	4
N(NO ₃ ⁻)	—	—	210	15	—	—	—	—	—	—	210	15
P(H ₂ PO ₄ ⁻)	—	—	31	3	—	—	31	3	—	—	31	3
S(SO ₄ ²⁻)	—	—	64	4	—	—	224	14	—	—	64	4
Cl ⁻	—	—	—	—	—	—	177,2	5	—	—	35,4	1

* б/в — безводный.

кислая соль. Нитраты — физиологически щелочные соли, поскольку ион NO_3^- поглощается с большей скоростью, чем ион калия, а тем более кальция. Поэтому постепенно питательный раствор подщелачивается. При этом дефицит в анионах компенсируется выделяемым корнями растений диоксидом углерода, образующимся в процессе дыхания. Анионы HCO_3^- с ионами Ca^{2+} дают бикарбонат кальция, который гидролизует до сильного основания и слабой кислоты:



Аммонийные соли сильных кислот, включая нитрат аммония, — физиологически кислые соли, так как растения сильнее поглощают ионы аммония, выделяя ионы водорода H^+ и подкисляя среду.

Нормальные питательные растворы — физиологически уравновешены (сбалансированны). На растворах, содержащих только одну питательную соль, растения развиваются хуже, чем на смеси солей. Каждый ион в отдельности угнетает растение, однако в смеси вредное влияние одних ионов нейтрализуется другими. Это явление, получившее название антагонизма ионов, особенно присуще катионам. Так, кальций играет роль главного антагониста всех других катионов, в том числе и ионов водорода. При достаточной концентрации кальция растения меньше страдают от кислотности питательного раствора.

В отличие от двухвалентных катионов одновалентные в растительных клетках присутствуют преимущественно в ионной форме и потому особенно сильно изменяют ионный баланс клеток, их мембранный потенциал. При этом нарушаются регуляторные функции мембран, что приводит иногда к гибели отдельных клеток, органов, целого растения.

При определенных концентрациях и соотношениях ионов, например, калия и кальция, фосфатов и сульфатов наблюдается явление, получившее название *синергизма*, т. е. ускорение поглощения одних ионов в присутствии других по сравнению с их поглощением из растворов одиночных солей. Наконец, следует отметить строгое суммирование действия присутствующих в растворе солей — *аддитивизм*, что, например, наблюдается при осмотических явлениях.

Природные пресные воды (речная, озерная, прудовая, колодезная) физиологически уравновешены, как и растворы нормальных почв. Дистиллированная вода содержит только ионы H^+ и непригодна для длительного использования при уходе за растениями. Предельно допустимая суммарная концентрация катионов и анионов уравновешенных питательных растворов составляет примерно 30 мг-моль/л.

Работа 57. ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СМЕСИ НА РОСТ РАСТЕНИЙ

Вводные пояснения. Исключение любого из макро- и микроэлементов приводит к расстройству структур и обмена веществ растений, торможению их роста и в последующем — к гибели. Однако видимые повреждения проявляются не сразу и не одновременно. Наиболее быстро сказывается исключение азота и кальция: первого из-за высокой потребности в нем растущих растений, второго — из-за неспособности к повторному использованию, или реутилизации. К неретутилизируемым или трудно утилизируемым минеральным элементам относятся многие микроэлементы, кроме бора, селена, мышьяка. Высокой степенью реутилизации отличаются азот, фосфор, сера, калий, натрий, в меньшей степени — магний. Поэтому недостаток перечисленных элементов проявляется в длительных опытах (более двух недель).

Порядок работы. Приготовление питательных смесей. Готовят полную питательную смесь по Хогланду — Снайдерсу и питательные смеси с исключением азота, фосфора и калия. При исключении из питательной смеси любого элемента связанные с ним элементы вносят в эквивалентных количествах в виде солей, не содержащих исключаемый элемент.

Для приготовления концентрированных маточных растворов солей, входящих в смесь Хогланда — Снайдерса, составляют рабочие таблицы, в которых указывают необходимое количество солей на выбранный объем раствора (табл. 41). Маточную смесь готовят из того расчета, что 10 мл раствора солей макроэлементов соответствует их количеству в 1 н. смеси Хогланда — Снайдерса (на 1 л или 1 кг субстрата). Микроэлементы вносят по 2 мл на 1 л питательной смеси. (Необходимость внесения микроэлементов и их выбор определяет преподаватель.)

41. Рабочая таблица для приготовления питательной смеси по Хогланду — Снайдерсу

Соль	Масса соли для приготовления маточного раствора, г	Для приготовления 1 л смеси Хогланда—Снайдерса добавляют маточного раствора, мл		
		1 норма	0,5 нормы	0,2 нормы
Микроэлементы (на 10 л)				
KNO ₃	510	10,0	5,0	2,0
Ca(NO ₃) ₂	10 %-й раствор	8,2	4,1	1,6
	d ₄ ¹⁸ 1,0771			
KH ₂ PO ₄	136	10,0	5,0	2,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	490	10,0	5,0	2,0

Микроэлементы (на 2 л)				
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,35	} Готовят в отдельных склянках		
H_3BO_3	0,55			
$ZnSO_4$	0,05			
$CuSO_4$	0,05			
MoO_3	0,024			
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	4,0			

Примечание. Посуда как для приготовления растворов макроэлементов, так и микроэлементов должна быть из цветного стекла, чтобы избежать размножения микроскопических водорослей.

Смесь без азота. В состав смеси азот входит в виде солей $Ca(NO_3)_2$ и KNO_3 . Для того, чтобы после исключения его из питательного раствора концентрации калия и кальция сохранялись на прежнем уровне, KNO_3 заменяют на KCl , а $Ca(NO_3)_2$ на $CaSO_4 \cdot 2H_2O$.

Расчет выполняют, пользуясь данными таблицы 40. Определим количество калия, связанного с анионом NO_3^- , в соли KNO_3 . Грамм-молекула KNO_3 (101,11 г) содержит 39,10 г калия, а в 0,51 г KNO_3 его находится x г; составляем пропорцию

$$\begin{aligned} 101,11 \text{ г} &- 39,10 \text{ г} \\ 0,51 \text{ г} &- x \text{ г}, \end{aligned}$$

отсюда

$$x = \frac{39,10 \cdot 0,51}{101,11} = 0,20 \text{ г}.$$

Определяем, какое количество KCl необходимо внести в питательную смесь, чтобы сохранить количество калия, эквивалентное его содержанию в 0,51 г KNO_3 . Грамм-молекула KCl (74,60 г) содержит 39,10 г калия, а 0,20 г калия находится в x г KCl :

$$74,60 \text{ г} - 39,10 \text{ г}$$

$$x \text{ г} - 0,20 \text{ г},$$

отсюда

$$x = \frac{74,60 \cdot 0,20}{39,10} = 0,38 \text{ г}.$$

Итак, вместо 0,51 г KNO_3 , исключенного по азоту из питательной смеси, в раствор вносят эквивалентное по содержанию калия количество KCl , равное 0,38 г.

Определяем количество кальция, связанного в соли $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Грамм-молекула $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (164,10 г) содержит 40,08 г кальция, а в 0,82 г $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ его находится x г:

$$164,10 \text{ г} - 40,08 \text{ г}$$

$$0,82 \text{ г} - x \text{ г},$$

отсюда

$$x = \frac{0,82 \cdot 40,08}{164,10} = 0,20 \text{ г}.$$

Определим, сколько необходимо внести $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, чтобы сохранить количество кальция, эквивалентное его содержанию в 0,82 г $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Грамм-молекула $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (172,16 г) содержит 40,08 г кальция, а в 0,20 г находится x г $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:

$$172,16 \text{ г} - 40,08 \text{ г}$$

$$x \text{ г} - 0,20 \text{ г},$$

отсюда

$$x = \frac{172,16 \cdot 0,20}{40,08} = 0,86 \text{ г}.$$

Следовательно, вместо 0,82 г $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ вносят 0,86 г $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Смесь без фосфора. Соль KH_2PO_4 замещают солью KCl . Расчеты выполняют по приведенному выше образцу:

KH_2PO_4	— К	KCl	— К
136,20	— 39,10	74,60	— 39,10
0,136	— x_1 ,	x_2	— 0,04,

$$x_1 = \frac{39,10 \cdot 0,136}{136,20} = 0,04 \text{ г}; \quad x_2 = \frac{74,60 \cdot 0,04}{39,10} = 0,07.$$

Итак, вместо 0,136 г KH_2PO_4 берут 0,07 г KCl .

Смесь без калия. Соль KH_2PO_4 заменяют $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, а соль KNO_3 — NaNO_3 . Вначале по известным пропорциям определяют содержание Р в 0,136 г KH_2PO_4 , затем вычисляют эквивалентное по фосфору количество $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$:

$$\begin{array}{rclcl} \text{KH}_2\text{PO}_4 & - \text{Р} & & \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} & - \text{Р} \\ 136,20 \text{ г} & - 31,00 \text{ г} & & 138,00 \text{ г} & - 31,00 \text{ г} \\ 0,136 \text{ г} & - x \text{ г}, & & x \text{ г} & - 0,031 \text{ г}, \\ x = \frac{31,00 \cdot 0,136}{136,20} = 0,031 \text{ г}; & & x = \frac{138,00 \cdot 0,031}{31,00} = 0,138 \text{ г}. \end{array}$$

Следовательно, соли NaH_2PO_4 на 1 л смеси берут 0,138 г. Аналогично вычисляем необходимое и эквивалентное по азоту количество NaNO_3 вместо 0,51 г KNO_3 . Из таблицы известно, что концентрация калия в соли KNO_3 составляет 0,005 г-моль/л. Зная, что масса грамм-молекулы NaNO_3 составляет 85,00 г, необходимое количество этой соли, соответствующее 0,005 моль/л Na, будет равно:

$$85,00 \cdot 5/1000 = 0,42 \text{ г}.$$

Подобным же образом можно проводить расчеты при исключении других катионов и анионов смеси.

Закладка опыта и учет результатов. В литровую банку наливают 700 мл водопроводной воды, поочередно вводят туда в виде растворов все соли питательной смеси ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ вносят в порошок). После прибавления очередного раствора содержимое сосуда помешивают стеклянной палочкой. После внесения всех солей доливают водой до отметки 850 или 900 мл. Закрывают банку деревянной пробкой, служащей опорой для растения. Высаживают в отверстия пробки одинаковое число выравненных проростков и закрепляют их негигроскопичной ватой.

Корни погружают в раствор, уровень которой должен быть ниже пробки, в зависимости от длины корней на 1...5 см. Закрывают корни от света и предохраняют раствор от перегрева, для чего оборачивают банку бумажным чехлом или помещают ее в холщовый мешок (желательно, чтобы внутренняя сторона его была черная, а наружная — белая). Прикрепляют этикетку, на которой простым карандашом обозначают факультет, номер группы, фамилию и вариант опыта.

42. Развитие растений в зависимости от состава питательной смеси

Питательная смесь	Повторность	Высота растения, см	Число листьев	Масса надземной части		Масса корней		Отношение массы надземной части к массе корней	Число устьиц в поле зрения микроскопа	Внешний вид растений (окраска листьев, характер повреждений)
				г/сосуд						
				сырой	сухой	сырой	сухой			

Полная
Без N
Без P
Без K

Питательные растворы ежедневно продувают воздухом через распылители при помощи компрессора или резиновой груши в течение 15...20 мин. По мере убыли питательного раствора за счет транспирации сосуда доливают водой до исходного уровня. Длительность опыта четыре недели.

Результаты опыта учитывают по форме (табл. 42).

Материалы и оборудование. Литровые стеклянные банки, бумажные чехлы для банок, шпагат, деревянные пробки, бюретки на 50 мл.

Проростки растений, концентрированные растворы KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KCl , NaCl , KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, приготовленные с таким расчетом, чтобы 5...10 мл такого раствора соответствовали концентрации соли в нормальной смеси Хогланда—Снайдерса; навески с $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5 %-й раствор цитрата или тартрата железа; растворы борной кислоты и сульфата марганца.

Работа 38. СМЕЩЕНИЕ pH ПИТАТЕЛЬНОГО РАСТВОРА КОРНЕВОЙ СИСТЕМОЙ РАСТЕНИЙ

Вводные пояснения. Корни способны активно смещать реакцию среды небуферных растворов в результате постоянного выделения цитоплазмой ионов H^+ , амфолитонидных свойств цитоплазмы, выделения органических кислот из клеток, ионообменных свойств пектоцеллюлозных клеточных стенок. Смещение pH может достигать значительных величин, соответствуя изменению концентрации H^+ на два-три порядка.

Порядок работы. Готовят растворы питательной смеси Хогланда—Снайдерса с pH 5; 6; 7 и 7,8. Для этого в четыре пробирки наливают по 5 мл 0,5 н. смеси и в каждую добавляют четыре-пять капель универсального

индикатора. Для получения заданных значений рН в пробирки по каплям добавляют 0,01 н. раствор НСІ или NaOH до появления окраски, соответствующей стандартной шкале по Алямовскому. Определенным объемом питательной смеси заполняют четыре широкие пробирки и в каждую добавляют во столько раз большее число капель кислоты или щелочи, во сколько раз объем широких пробирок превышает 5 мл. В приготовленные растворы погружают корни проростков пшеницы (или других растений) и через 2 ч определяют рН питательного раствора.

Результаты опыта учитывают по форме (табл. 43).

43. Схема записи определений рН

Вариант	рН питательной смеси	
	в начале опыта	в конце опыта
1	5,0	
2	6,0	
3	7,0	
4	7,8	

Материалы и оборудование. 0,5 н. раствор питательной смеси Хогланда — Снайдерса, 0,01 н. раствор NaOH, 0,01 н. раствор НСІ, проростки растений, универсальный индикатор.

Конические колбы, пробирки и штативы для пробирок, широкие пробирки, пипетки на 1 мл, градуированные пипетки на 10 мл, прибор Алямовского для колориметрического определения рН или рН-метр.

Работа 59. РОСТ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ В РАСТВОРЕ ЧИСТОЙ СОЛИ И СМЕСИ СОЛЕЙ (АНТАГОНИЗМ ИОНОВ)

Вводные пояснения. Подбирая различные концентрации отдельных ионов, можно составить такую их комбинацию, при которой данные растения будут развиваться лучше всего. Такой раствор называют уравновешенным.

Порядок работы. В конические колбы на 100 мл наливают растворы по схеме опыта и закрывают горла колб пропарафинированными марлевыми крышками. На каждую марлевою крышку высаживают одинаковое количество проростков пшеницы. Корни погружают в раствор. Спустя две недели измеряют высоту проростков,

44. Развитие растений в зависимости от состава питательной смеси

Вариант	Раствор	Объем раствора, мл	Длина надземной части, см	Длина корней, см
1	Полная смесь:			
	NaCl	100		
	CaCl ₂	1		
	KCl	2		
2	CaCl ₂	100		
3	NaCl	100		
4	KCl	100		

Примечание. Все растворы отдельных солей 0,12 н.

число и длину корней и делают соответствующие выводы.

Результаты записывают по форме таблицы 44.

Материалы и оборудование. Растворы химически чистых солей — KCl, CaCl₂, NaCl, десятидневные проростки пшеницы.

Конические колбы на 100 мл, марля, шпагат, крафт-бумага.

Работа 60. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЪЕМА КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ МЕТОДОМ САБИНИНА И КОЛОСОВА

Вводные пояснения. Разработанный Д. А. Сабининым и И. И. Колосовым метод позволяет определять объем корней с ошибкой не более 5...7 %, что значительно превышает точность метода установления объема по количеству вытесненной воды из сосуда при погружении в него корней (ошибка 20...25 %). Объем корней определяют при помощи специального объемомера (рис. 24).

Прибор состоит из стеклянного цилиндра 1, нижняя часть которого вытянута в трубку 2, соединенную каучуковой трубкой 3 с градуированной пипеткой 4 (емкость пипетки 1...2 мл, цена деления 0,01...0,02 мл). Оттянутый конец пипетки необходимо отрезать. Объем стеклянного цилиндра подбирают по размеру корневой системы. Чем меньше диаметр цилиндра, тем чувствительней прибор. Стеклянный цилиндр укрепляют в штативе вертикально, а градуированную пипетку — под небольшим углом к горизонту.

В прибор наливают воду или раствор, в котором росли растения. При погружении корней в сосуд уровень воды в нем поднимается и переходит из положе-

ния AA' в положение BB' . По закону сообщающихся сосудов водный мениск в пипетке также поднимается, но поскольку она наклонена к горизонтали, то водный мениск в ней передвинется на большее расстояние, чем вода в цилиндре ($A''B''$).

Как видно из рисунка, изменение уровня воды в цилиндре I соответствует катету $B''C$ треугольника $A''B''C$, а передвижение мениска в капилляре — его гипотенузе $A''B''$. Обозначив стороны треугольника буквами a , b , c , а угол между сторонами a и b греческой буквой α , получим

$$\sin \alpha = \frac{c}{a},$$

откуда

$$a = \frac{c}{\sin \alpha} = c \frac{1}{\sin \alpha}.$$

Следовательно, сдвиг мениска в пипетке равен изменению уровня воды в цилиндре, умноженному на $1/\sin \alpha$. Отсюда, меняя положение пипетки, можно изменять чувствительность прибора. Она тем больше, чем меньше угол α к горизонтали у пипетки.

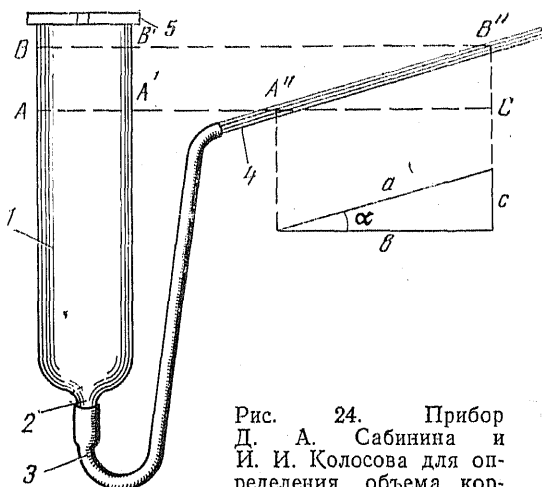


Рис. 24. Прибор Д. А. Сабинина и И. И. Колосова для определения объема корней:

1 — цилиндрический сосуд с оттянутым концом (2); 3 — каучуковая трубка; 4 — градуированная пипетка; 5 — пробка; AA' — исходный уровень воды в цилиндре; BB' — уровень воды в цилиндре после погружения корней; A'' — исходное положение мениска в пипетке; B'' — положение мениска в пипетке после погружения корней

Порядок работы. Внутренние поверхности цилиндра и пипетки тщательно промывают свежеприготовленной хромовой смесью с водой. Прибор укрепляют в штативе и наливают дистиллированную воду или раствор, в котором росли растения. Уровень жидкости в цилиндре должен быть на 2...3 см ниже верхнего края. Пипетку укрепляют на такой высоте, чтобы уровень жидкости в ней совпадал с началом градуированной части. Вытесняют из прибора пузырьки воздуха. После проверки прибора определяют объем корней. Растения складывают в пучки так, чтобы корневые шейки были на одном уровне, и закрепляют при помощи ваты в отверстии разрезанной пополам пробки. Обе половинки пробки связывают по окружности ниткой и дают стечь раствору с корней. Затем остатки капельно-жидкой воды снимают с корней влажной фильтровальной бумагой, отмечают положение мениска A'' в пипетке объемомера и погружают корни в цилиндр.

В результате погружения корней в объемомер уровень жидкости в цилиндре повысится, и мениск в пипетке сдвинется до положения B'' . Затем корни вынимают из цилиндра, дают стечь воде с них в цилиндр.

Если после стекания всей воды уровень ее в пипетке не достигнет вновь положения A'' , то, не меняя наклона пипетки, воду доливают в цилиндр, пока мениск в пипетке не займет положения A'' . Приливают в цилиндр воду из бюретки до тех пор, пока мениск в пипетке не займет вновь положения B'' . Прилитый объем воды равен объему измеряемых корней. Определение повторяют два-три раза и рассчитывают среднюю величину.

Работу необходимо выполнять быстро, чтобы корни не подсыхали. Для устранения ошибки из-за разности в осмотическом давлении желательно измерять объем корней в питательном растворе, в котором они росли.

Материалы и оборудование. Проростки растений.

Объемомер Сабина и Колосова, бюретки, корковая пробка несколько большего диаметра, чем диаметр цилиндрического сосуда объемомера, вата, суровые нитки.

**Работа 61. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ И РАБОЧЕЙ
АДСОРБИРУЮЩЕЙ ПОВЕРХНОСТИ
КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ МЕТОДОМ САБИНИНА
И КОЛОСОВА**

Вводные пояснения. Важнейшие характеристики состояния корневой системы — ее масса и поглощающая поверхность. Считается, что в интервале между апикальной и базальной частями корня активное поглощение меняется и даже выделяют специальную поглощающую зону корня. Поэтому определяют как общую, так и рабочую поверхность корня. Д. А. Сабинин и И. И. Колосов, считавшие, что первичный акт поглощательного процесса — адсорбция, разработали метод определения общей поверхности корней, включающий рабочую и недействительную их поверхности.

Большинство поглощаемых корнем веществ не только адсорбируется, но и десорбируется с его поверхности. Поэтому размеры десорбции более значительны на тех участках корня, где отсутствует или замедлен процесс транспорта веществ внутрь корня. В качестве поглощаемого вещества, которое можно легко определить колориметрически, авторы метода выбрали метиленовую синюю. При мономолекулярной адсорбции 1 мг МС покрывает $1,05 \text{ м}^2$ поверхности адсорбента.

Зная исходную концентрацию раствора МС и после экспозиции в ней корней, по разности этих концентраций можно определить, какое количество красителя (мг) адсорбировалось корневой системой. Умножение этого количества МС на $1,05 \text{ м}^2$ дает величину поглощающей поверхности.

Метиленовая синяя проникает в клетки эпидермиса в течение 90 с. При двукратном погружении корней (каждый раз по полторы минуты) в раствор МС происходит адсорбция красителя на действительной и недействительной поверхности корней. При третьем погружении корня в раствор МС поглощается только действительной (рабочей) поверхностью корня. По изменению концентрации МС в двух первых стаканах рассчитывают общую поверхность корневой системы, а по результатам третьего определения — рабочую.

Концентрацию МС определяют колориметрически на фотоэлектроколориметре (см. раздел «Фотосинтез»). Калибровочный график для количественного определения МС готовят заранее лаборанты.

Наряду с определением общей, недеятельной и рабочей поверхностей корня желательнее проследить изменение этих параметров на корнях нормальных растений и голодающих по одному из основных элементов минерального питания. Поэтому предусматривают два варианта: контрольные растения, выращенные на полной смеси Хогланда — Снайдерса; опытные растения, выращенные при исключении из смеси одного из макроэлементов (N, P, K или Ca).

Порядок работы. Для работы лучше использовать корни растений, выращенных в водной культуре. Объединенные вместе корни десяти проростков образуют поглощающую корневую массу. Важно не допустить погружения в раствор МС зерновок, находящихся на десяти-четырнадцатидневных проростках. В три бюкса наливают 0,0003 н. раствор МС, объем которого должен быть примерно в десять раз большим, чем объем корней. В четвертый бюкс наливают раствор CaCl_2 . Слегка обсушив корни фильтровальной бумагой, последовательно погружают их в три бюкса с раствором МС на полторы минуты в каждый. После каждого погружения дают возможность раствору красителя стечь в тот же бюкс, из которого были вынуты корни.

Уменьшение концентрации метиленовой синей определяют, сравнивая найденную для каждого бюкса концентрацию после погружения с исходной, т. е. с 0,0003 н. раствором МС (112 мг метиленовой синей на 1 л; молекулярная масса МС с тремя молекулами воды равна 373,68 г), предварительно разбавленным, как и раствор МС в бюксах, в десять раз. Разбавление МС перед установлением ее концентрации повышает точность определения.

По количеству поглощенной метиленовой синей в первых двух бюксах рассчитывают общую адсорбирующую поверхность корней, по ее количеству, поглощенному в третьем бюксе, — рабочую адсорбирующую поверхность. Устанавливают разницу между общей и рабочей адсорбирующей поверхностями, что дает представление о недеятельной поверхности корней. Частное от деления величин общей и рабочей поверхности на объем корней (более грубо — на их сырую массу в граммах) дает представление о соответствующих величинах удельной адсорбирующей поверхности корней.

Окрашенные корни после извлечения из третьего

45. Определение адсорбирующей поверхности корней

Вариант	Номер бюкса	Объем раствора МС в бюксе, мл	Масса МС в бюксе, мг			Адсорбирующая поверх- ность. м ²						
			до погру- жения корней	после погру- жения корней	поглощенной	общая	рабочая	недействительная	удельная			
									общая	рабочая	недействитель- ная	
Контроль	1											
	2											
	3											
Опыт	1											
	2											
	3											

бюкса промывают водой и помещают в бюкс с CaCl_2 . Метиленовая синяя, несущая положительный заряд, в результате обменной адсорбции ионов Ca^{2+} выделяется из корней и окрашивает раствор в синий цвет.

Результаты опытов записывают по форме (табл. 45). Делают вывод о результатах работы в целом.

Материалы и оборудование. Десяти-четырнадцатидневные проростки растений, 0,0003 н. раствор метиленовой синей (на 1 л 112,0 мг предварительно подсушенной при 95...100 °С МС), 0,2 М раствор CaCl_2 (22,2 г/л).

Бюксы или стаканы на 25...50 мл, колориметры, калибровочный график на МС в интервале концентраций 1...12 мг/л, весы, фильтровальная бумага.

Работа 62. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ПОГЛОЩЕНИЯ ИОНОВ ОТ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОРНЕВЫХ СИСТЕМ

Вводные пояснения. Поглощение элементов минерального питания обеспечивается либо пассивными механизмами, например диффузией (обычно при концентрациях солей, превышающих 1 мМ), либо энергозависимым путем, т. е. с затратой энергии дыхания, когда концентрация солей меньше 1 мМ, что обычно наблюдается в почвенном растворе. Поглощение ионов калия, аммония, фосфата, нитрата, сульфата в сильной степени зависит от метаболической активности корня. Большинство двух-трехвалентных катионов поглощается только пассивным путем даже при концентрациях, меньших 10^{-3} М.

Известно, что энергозависимые механизмы поглощения ионов тесно связаны с дыханием корней, и, очевидно, если последний процесс подавить каким-либо ингибитором, то скорость поглощения соответственно уменьшится. В качестве такого ингибитора в работе используют динитрофенол — специфический разобщитель окислительного фосфорилирования, который останавливает образование АТФ на этапе появления высокоэнергетического интермедиата.

Цель работы — определение зависимости поглощения ионов калия и кальция от способов их поступления в ткани корня и времени поглощения.

Порядок работы. Десять проростков десяти-четырнадцатидневных растений пшеницы (овса, ячменя) погружают корнями в стаканы на 50 мл, заполненные следующими растворами:

в контрольные стаканы вносят по 10 мл 2,5 мМ раствора КСl и 5 мМ раствора CaCl_2 и доводят до 50 мл дистиллированной водой; таким образом, исходная концентрация калия соответствует 0,5, а кальция — 1 мМ/л;

в опытные стаканы вносят те же растворы солей, а затем 5 мл 10^{-3} М динитрофенола (ДНФ) и доводят объем дистиллированной водой до 50 мл; концентрация ДНФ в стакане соответствует 10^{-4} М.

Всего следует приготовить четыре стакана с контрольными растворами и три с опытными. Отобранные проростки одновременно погружают в первый контрольный и первый опытный стаканы, фиксируют время погружения. Через 30 мин проростки переносят в другую пару стаканов, затем также на 30 мин в третью. В интервале между погружениями в четвертом (без растений) стаканчике и в освободившихся от растений стаканчиках определяют концентрации калия — на пламенном фотометре, кальция — трилонометрическим методом.

Определение концентрации кальция трилонометрически. Для определения концентрации кальция трилонометрическим методом из стаканчика с исходной пробой и опытных стаканчиков берут по 20 мл раствора, помещают его в коническую колбочку на 100 мл, добавляют еще 20 мл дистиллированной воды. Затем вносят на кончике ножа индикатор на кальций (мурексид) и 2 мл 10%-го раствора КОН.

Раствор титруют 0,005 н. раствором трилона Б (динатриевая соль этилендиаминотетрауксусной кислоты). Конец титрования отмечается переходом окраски от интенсивного ярко-розового цвета в фиолетово-сиреневый: 1 мл пошедшего на титрование трилона соответствует 0,1 мг кальция.

Результаты определений записывают по форме (табл. 46 и 47). По полученным данным строят график зависимости поглощения калия и кальция от времени. На основании результатов опытов делают выводы.

46. Определение ионов калия

Вариант	Показания прибора				Концентрация K^+ , мМ				Поглощено K^+ , мМ		
	исходная проба	через 30 мин	через 60 мин	через 90 мин	исходная проба	через 30 мин	через 60 мин	через 90 мин	за 30 мин	за 60 мин	за 90 мин

Контроль
ДНФ

47. Определение ионов кальция

Вариант	Поглощение трилона Б, мл				Содержание Ca^{2+} в пробе, мг				Концентрация Ca^{2+} , мМ			Поглощено Ca^{2+} , мМ		
	исходная проба	через 30 мин	через 60 мин	через 90 мин	исходная проба	через 30 мин	через 60 мин	через 90 мин	через 30 мин	через 60 мин	через 90 мин	через 30 мин	через 60 мин	через 90 мин

Контроль
ДНФ

Определение концентрации калия и других элементов минерального питания пламенным фотометрическим методом. Перед определением калия на пламенном фотометре знакомятся с инструкцией по работе с прибором, пользуются указаниями и помощью преподавателя. Вычисления концентрации калия в стаканах выполняют с использованием калибровочного графика для калия в интервале концентраций 4...20 мг/л.

Метод пламенной фотометрии основан на возбуждении атомов химических элементов в пламени ацетилена или пропана. Возбужденное состояние определяемого элемента характеризуется отличным от другого элемента спектром излучения.

Количественное определение основано на зависимости между интенсивностью спектров излучения элемента и его концентрацией в растворе. Эта зависимость выражается уравнением:

$$I = aCb,$$

где I — интенсивность излучения; C — концентрация элемента; a и b — константы уравнения.

В пламенной фотометрии при определении концентрации калия используют следующие спектральные линии: 766,49 и 769,90 нм. Общая схема компоновки основных частей пламенного фотометра независимо от типа или марки представлена на рисунке 25.

При работе прибора опытный раствор 10 захватывается воздухом, поступающим от компрессора 1 через ресивер 12 и манометр 3 в горелку 8. Нормальное горение газа в горелке обеспечивается постоянством его давления, поддерживаемым при помощи манометра 4.

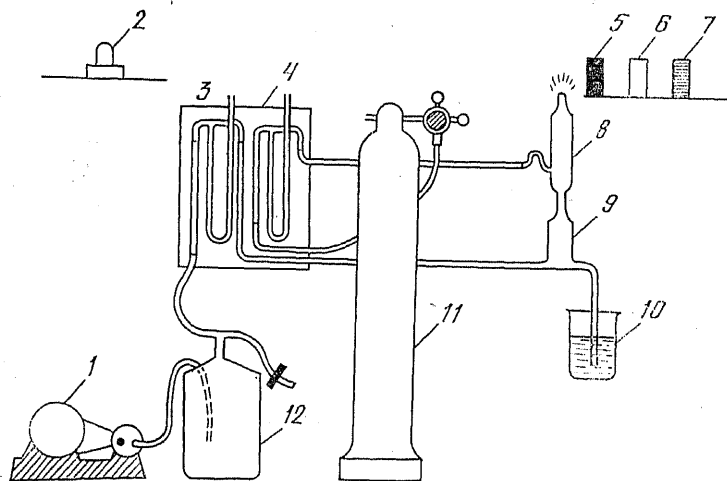


Рис. 25. Схема компоновки основных частей пламенного фотометра: 1 — компрессор; 2 — гальванометр; 3, 4 — манометры (3 — регулирования давления сжатого воздуха; 4 — регулирования давления газа); 5 — диафрагма; 6 — интерференционный светофильтр; 7 — фотоэлемент; 8 — горелка; 9 — смеситель; 10 — опытный раствор; 11 — баллон с ацетиленом; 12 — ресивер

Спектр излучения, выделяемый возбужденными атомами калия, проходит через диафрагму 5, регулирующую поток излучения, затем интерференционный светофильтр 6 и, наконец, попадая на фотоэлемент 7, генерирует электрический ток, направляемый на гальванометр 2. Величина генерируемого тока пропорциональна интенсивности спектрального излучения (соответственно концентрации калия в анализируемом растворе).

При определении содержания калия в образцах необходимо каждые 10...15 определений контролировать получаемые результаты, сверяя их с воспроизводимостью результатов анализа стандартных растворов или растворов, используемых для построения калибровочного графика.

Для приготовления стандартного раствора калия на аналитических весах отвешивают 1,910 г KCl (чистый для анализа) и растворяют в литровой мерной колбе с дистиллированной водой. Такой раствор содержит точно 1000 мг калия в 1 л. Для приготовления калибровочной шкалы, например, на ряд концентраций 4, 6, 10, 15, 20 мг K⁺ на 1 л берут из стандартного раствора последовательно 4, 6, 10, 15, 20 мл и каждую порцию доводят до 1 л дистиллированной водой.

Материалы и оборудование. Десяти-четырнадцатидневные проростки пшеницы (овса, ячменя); стандартный раствор трилона Б, приготовленный растворением 9,3 г трилона в 1 л дистиллированной воды; рабочий раствор трилона, соответствующий концентрации 0,005 н., приготовляемый разбавлением стандартного раствора в десять раз; 10 %-й раствор KOH; 1 %-й мурексида, приготовленный при тщательном растирании 1 г мурексида с 99 г K₂SO₄; 2,5 мМ раствор KCl (10 л) в бутылки с бюреткой; 5 мМ раствор CaCl₂ (10 л) в бутылки с бюреткой; 10⁻³ М раствор 2,4-ДНФ в склянках.

Пламенный фотометр, бюретки для трилонометрического титрования, стаканы на 50 мл, пипетки на 2 и 10 мл, калибровочный график на калий в интервале концентраций 4...20 мг/л, фильтровальная бумага.

Работа 63. ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ АЗОТНОГО ПИТАНИЯ И МОЛИБДЕНА НА НИТРАТРЕДУКТАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ТКАНЕЙ РАСТЕНИЯ

Вводные пояснения. Нитратредуктаза — фермент, непосредственно участвующий в восстановлении нитратов до нитритов. В состав его активного центра входит молибден. Синтез и активирование нитратредуктазы наблюдается только в присутствии нитратов. Другие источ-

ники азота не индуцируют синтез фермента и не влияют на его активность.

В связи с адаптивным характером фермента при постановке опытов необходимо используемые соли питательных элементов перекристаллизовывать, а питательные смеси готовить на бидистиллированной воде.

Порядок работы. Опыт осуществляют с растениями овса, выращенными на 0,2 н. измененной питательной смеси Хогланда — Снайдерса, в которой нитратный азот заменен на аммонийный — $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в эквивалентных по азоту количествах. В этом случае нитрат кальция и калия заменяют на соответствующее количество сульфатов (образец расчета приведен в работе 57).

Растения выращивают в течение 10...14 дней при pH 6...6,2, после чего часть растений ($\frac{2}{3}$ общего количества) переносят на 0,2 н. неизмененную питательную смесь с KNO_3 и $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ в качестве источника азота и выдерживают на ней двое-три суток. Другую часть растений оставляют на то же время на смеси прежнего состава с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; при этом смесь следует обновить.

В свою очередь, растения на нитратном фоне также делят на две группы: одна получает молибден (+Mo), другая — нет (—Mo). Таким образом, в опыте три варианта: контроль (источник азота — нитраты + молибден) и два опытных (источник азота — нитраты без молибдена; источник азота — аммонийный азот).

Определение активности нитратредуктазы по Мульдеру. Листья или корни нарезают острой бритвой полосками или дисками шириной около 2 мм, берут навески по 0,5 г и помещают в трубки Тунберга. Затем в каждую трубку вносят по 5 мл фосфатного буфера (0,06 М, pH 7.2), 1 мл 0,1 М раствора яблочной кислоты, нейтрализованного предварительно содой (до прекращения выделения пузырьков), 1 мл 0,1 М раствора KNO_3 и 2 мл воды. В шарики пробок трубок Тунберга вводят по 1 мл уксусной кислоты.

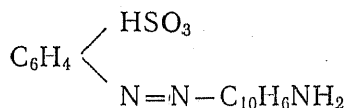
Чтобы срезы растительного материала не всплывали, в трубки помещают тщательно промытую вначале концентрированной серной кислотой, а затем водой стеклянную вату. После этого трубки закрывают пробками и удаляют из них воздух вакуумным насосом в течение 2 мин. Далее, соединяя поворотом пробки пространство

трубки с наружным воздухом, инфильтруют раствор и кусочки ткани.

Реакция восстановления нитратов до нитритов идет в анаэробных условиях, поэтому воздух из трубок вновь выкачивают в течение 5 мин. Затем выдерживают в ванне термостата при 37°C 30 мин. После этого реакцию останавливают, перелив уксусную кислоту из шарика в реакционную среду. Если раствор мутный, в него для осаждения белков добавляют 3 мл насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Надосадочную жидкость используют для определения нитритов. Для этого из каждой трубки отбирают пипеткой в пробирки по 10 мл раствора и добавляют по 2 мл реактива Грисса. Одновременно ставят контроль на реактивы: уксусную кислоту и насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ добавляют в реакционную смесь перед удалением воздуха.

Определение азота нитритов. Метод основан на образовании из сульфаниловой кислоты, α -нафтиламина и нитритов азосоединения, окрашенного в розовый цвет. Реакция идет в две стадии. Вначале сульфаниловая кислота, взаимодействуя с HNO_2 , дает диазосоединение, которое затем в реакции с α -нафтиламином превращается в конечный продукт:



Линейная зависимость между окраской и содержанием иона NO_2^- сохраняется при концентрации $\text{N}-\text{NO}_2$ до 2 мг/л.

Оптическую плотность окрашенных растворов определяют на ФЭК, используя синий светофильтр. Так как окраска развивается медленно и в то же время при стоянии раствора исчезает, то измерения необходимо выполнять через равные промежутки после прибавления реактива Грисса, обычно через 15...20 мин.

Концентрацию азота в пробе ($\text{N}-\text{NO}_2$) рассчитывают по калибровочному графику. Для получения данных для его построения используют дважды перекристаллизованный нитрит натрия, высушенный при 85°C до постоянной массы. При приготовлении стандартного маточного раствора навеску $\text{N}-\text{NO}_2$ в 0,4927 г (в 1 мл содержится 0,1 мг N), взвешенную на аналитических ве-

сах, переносят в мерную колбу на 1 л, доливают водой до метки. Раствор хранят в темной склянке в холодильнике.

Рабочий раствор получают разбавлением маточного в день определения нитратного азота. Для построения калибровочного графика используют концентрации $N-NO_2$ в интервале 0,02...0,5 мг/л.

Нитритный реактив Грисса состоит из равных объемов растворов сульфаниловой кислоты и α -нафтиламина. Для приготовления сульфаниловой кислоты 0,5 г химически чистого реактива растворяют в 100 мл 32 %-го раствора ($d=1,04$) уксусной кислоты. Вначале уксусную кислоту разбавляют дистиллированной водой вдвое, а затем доводят до нужной плотности по ареометру. Другой компонент смеси готовят растворением 0,1 г α -нафтиламина в 20 мл воды при нагревании; раствор фильтруют через стеклянный фильтр № 1 в колбу, содержащую 180 мл уксусной кислоты ($d=1,04$).

Результаты опыта записывают по форме таблицы 48. На основании полученных результатов делают выводы.

48. Активность нитратредуктазы в органах растений, мг $N-NO_2$ /г сырой массы

Объект исследования	Условия питания	Показания шкалы ФЭК	Масса $N-NO_2$ в пробе, мг	Масса $N-NO_2$ на 1 г сырой массы, мг	Примечание
Листья	+ NO_3 +Mo				
	(контроль)				
	+ NO_3 -Mo				
Корни	+ NH_4 +Mo				
	+ NO_3 +Mo				
	(контроль)				
	+ NO_3 -Mo				
	+ NH_4 +Mo				

Материалы и оборудование. Десяти-четырнадцатидневные проростки овса, смесь Хогланда—Снайдерса на перекристаллизованных солях, насыщенный раствор $(NH_4)_2SO_4$, уксусная кислота, 0,06 М фосфатный буфер (рН 7,2), 0,1 М раствор яблочной кислоты, соль Na_2CO_3 , 0,1 М раствор KNO_3 ; стеклянная вата, промытая концентрированной серной кислотой, а затем водой; реактив Грисса; калибровочный график для определения $N-NO_2$.

Пробирки Тунберга, пробирки на 15 мл, пипетки на 1,5 и 10 мл, фотоэлектроколориметр, термостатная ванна, ареометры.

ОБМЕН ВЕЩЕСТВ

Обмен веществ — процесс, поставляющий все необходимые для жизнедеятельности организма соединения, а также энергию. Энергию, необходимую для сохранения сложной структуры живой растительной клетки, называют *поддерживающей*. Энергию, затрачиваемую на осуществление большинства функций клетки, например поглощение и выделение веществ, движение протопласта, новообразование органелл, реакции биосинтеза различных веществ, называют *функциональной*.

Обмен веществ клетки представляет собой огромное число физических и химических реакций, объединенных в пространстве и во времени в единое упорядоченное целое и подчиняющихся законам термодинамики. Упорядоченность реакций достигается благодаря ферментам, которые представляют собой биокатализаторы, в функции которых входит регулирование скорости отдельных химических реакций обмена веществ. Другим, не менее важным, регулирующим фактором служит молекулярная ультраструктура клетки, или ее пространственная организация (компарментация), заключающаяся в том, что клетка подразделена на микроскопические и субмикроскопические отсеки, в которых при помощи определенных групп ферментов происходят соответствующие реакции обмена веществ.

Механизмы регуляции в живых организмах, в том числе и растениях, определяют направленность обмена веществ. Так, по отношению к неблагоприятным внешним факторам растения способны отвечать определенными состояниями (изменением температуры тела, интенсивности дыхания, скорости поглощения элементов питания и т. д.). Явление саморегуляции становится возможным благодаря принципу обратной связи, когда продукт отдельно взятой реакции внутреннего или внешнего обмена веществ влияет на всю взаимосвязанную цепь реакций через ферменты (*ферментная регуляция*) или нуклеиновые кислоты (*генная регуляция*).

Одно из важнейших условий осуществления процессов жизнедеятельности растительного организма — постоянное снабжение его энергией. Источниками энергии (свободной энтальпии) служат процессы окисления ор-

ганических веществ клетки, диссимиляция (катаболические процессы, которые являются экзергоническими). Различают две основные формы диссимиляции — дыхание и брожение. Процессы образования биологических соединений и веществ, поступающих из внешней среды, — биосинтетические процессы (анаболические) идут с затратой энергии (эндергонические), т. е. представляют собой ассимиляцию. Важнейший биосинтетический процесс — ассимиляция углерода зелеными растениями и бактериями путем использования энергии света (фотосинтез) или энергии других химических реакций (хemosинтез).

Исходя из вышесказанного, обмен веществ можно определить как совокупность катаболических и биосинтетических процессов или совокупность эндергонических и экзергонических реакций, объединенных в пространстве и происходящих во времени.

Понятие обмена веществ подразумевает образование и превращение как первичных, так и вторичных растительных продуктов. Такие важнейшие первичные органические соединения, как углеводы, липиды, белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, органические кислоты, встречаются в каждой растительной клетке и интенсивно превращаются в основном обмене веществ. Наряду с этим существуют локально синтезируемые и медленно перемещаемые вторичные вещества, образующиеся в ходе процессов вторичного обмена (например, алкалоиды, гликозиды, сапонины). Указанные вещества, как правило, не служат ни источниками энергии, ни запасными веществами.

Цель лабораторных работ данного раздела — ознакомление с современными, не особенно сложными и доступными для лабораторий методами биохимических исследований обмена веществ растений.

Определение содержания белков и активности протеиназ осуществляют в процессе прорастания и формирования семян. Прорастание зерновки пшеницы или ржи первоначально характеризуется структурной дезагрегацией белкового комплекса клейковины с постепенным разрывом водородных и дисульфидных связей, затем сопровождается гидролизом высокомолекулярных белков до низкомолекулярных белков, пептидов и аминокислот, из которых строятся белки растущего зародыша. Максимальная скорость гидролиза запасных бел-

коя совпадает с максимумом скорости роста проростка. Однако семядоли и эндосперм прорастающих семян не только обеспечивают растущий зародыш запасными питательными веществами, но способны также к синтезу *de novo* определенных ферментов. В запасающих тканях происходит синтез РНК, а также ее деградация.

Как правило, запасные белки в семенах растений откладываются в виде алейроновых зерен — белковых тел, содержащих в среднем, %: белка — 69; липидов — 22; нуклеиновых кислот — 61; фитиновой кислоты — 4. При образовании, например, зерновки пшеницы в ходе развития эндосперма в клетках увеличивается число белковых тел и их размер. Накопление отдельных фракций белков в процессе формирования зерна пшеницы, кукурузы, ячменя идет следующим образом: альбумины и глобулины синтезируются в зерне на более ранних фазах, чем проламины и глютенины. Накопление последних наиболее интенсивно происходит с начала фазы молочной спелости и продолжается до конца созревания зерна.

Работа 64. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СУММАРНЫХ БЕЛКОВ

Вводные пояснения. Существует несколько методов количественного определения белков в растительных и животных тканях: колориметрический, спектрофотометрический, а также по количеству азота, содержащегося в чистом препарате белков после минерализации последнего.

Порядок работы. Подготовительные операции. Экстракция белков и тканей растений основана на способности белков при разрушении клеток (обработка детергентами, ультразвуком, растирание материала в ступке с кварцевым песком, гомогенизация в блендере, размалывание на ударных и шаровых мельницах сухого растительного материала) растворяться в воде, растворах солей, органических соединениях, кислотах и щелочах, буферных растворах. Буферные растворы обеспечивают мягкие условия выделения белков, при которых сохраняется природная структура их молекул. Для выделения большей части белковых веществ (препарат суммарного белка) используют буферные растворы с рН 8.

Выделение суммарных белков из свежего растительного материала. Помещают в фарфоровую ступку 0,5 г сырых семян проросших семян зернобобовых (люпин, горох, фасоль) или 1 г зерновок пшеницы, ржи (без корешков и побегов). Добавляют небольшое количество промытого и прокаленного кварцевого песка и растирают с 40 мл боратного буфера (рН 10), в который добавлено 0,2 % бисульфита натрия и несколько капель октилового спирта. Затем количественно переносят содержимое в два-три приема в коническую колбу на 100 мл. Ступку и пестик дважды ополаскивают небольшим количеством (по 5 мл) боратного буфера, промывные воды также сливают в колбу. Общий объем раствора в колбе должен составлять 50 мл.

Выделение суммарных белков из сухого растительного материала. Взвешивают на аналитических весах 0,3 г размолотых до состояния муки сухих семян бобовых или 0,8...1 г зерновок, полученных после прорастания. Навеску помещают в коническую колбу на 100 мл, заливают 50 мл боратного буфера с рН 10, содержащего 0,2 % бисульфита натрия и пять-шесть капель октилового спирта. Колбу тщательно закрывают пробкой и оставляют на 1 ч при комнатной температуре, чтобы сухой материал впитал в себя буфер. Затем колбу помещают в ротатор.

Последующие операции при выделении суммарных белков общие для обоих видов экстракции.

Содержимое колб взбалтывают на ротаторе в течение 1 ч. Затем колбы вынимают из ротатора, открывают пробки и дают раствору суммарных белков отстояться в течение 15 мин. Затем при помощи пипетки из верхней части раствора осторожно отбирают 10 мл и количественно переносят в центрифужные пробирки, помещенные в специальный штатив. Пробирки помечают восковым карандашом, уравнивают между собой (добавляя буфер с рН 10). Если пользуются центрифугой со свинг-ротором, помещают в центрифугу и центрифугируют 15 мин (время исчисляют с момента выхода ротора центрифуги на заданное число оборотов). По окончании центрифугирования пробирки помещают в штатив и пипеткой отбирают 1 мл надосадочной жидкости и переносят в другую чистую стеклянную пробирку. Туда же приливают 9 мл боратного буфера с рН 10,

тщательно перемешивают, после чего раствор суммарных белков готов к спектрофотометрированию.

Спектрофотометрический метод. Содержание белков можно определить на любом отечественном спектрофотометре. Описание спектрофотометра СФ-26 и приемы работы на нем даны в работе 39.

Ароматические аминокислоты тирозин и триптофан, содержащиеся в белках, поглощают свет в области 280 нм. Однако сильное поглощение ультрафиолетовых лучей в этой области характерно и для нуклеиновых кислот, хотя в целом пик поглощения последними ультрафиолетовых лучей приходится на область спектра 260 нм. Поэтому при определении концентрации белка в растворах названным методом показания светопоглощения (синонимы — оптическая плотность, экстинкция) снимают при 280 и 260 нм. Показания светопоглощения шкалы прибора подставляют в уравнение Варбурга — Христиана:

$$C = 1,55 \cdot E_{280} - 0,76 \cdot E_{260};$$

где C — концентрация белка, мг/мл; E_{280} и E_{260} — светопоглощение раствора белков при 280 и 260 нм; 1,55 и 0,76 — расчетные коэффициенты.

В одну из кварцевых кювет спектрофотометра на $\frac{2}{3}$ объема наливают раствор исходного боратного буфера (эталон) и устанавливают ее в гнездо № 1 кюветодержателя. В другие три кюветы помещают исследуемые растворы белков и ставят в гнезда 2, 3, 4 кюветодержателя. Кюветодержатель устанавливают в кюветную камеру. Операции по измерению коэффициентов светопоглощения эталонного и рабочих растворов аналогичны таковым при определении содержания пигментов в вытяжке из листьев (см. работу 39). Результаты записывают по форме (табл. 49).

Окончательный расчет содержания суммарных белков в навеске злаковых и зернобобовых культур (мг/г сухой массы) выполняют по формуле

$$ССБ = \frac{C \cdot 50 \cdot 10}{H} \cdot \times \frac{100}{86 \text{ или } 60},$$

где H — навеска растительного материала, г; 50 — объем экстрагирующего раствора, мл; 10 — разведение; 86 — сухая масса воздушносухой навески, %; 60 — сухая масса проросших семян, %.

49. Определение белков в растении

Вариант	Навеска растительного материала (Н), г		Объем экстракта белков (V), мл	Светопоглощение при		Концентрация белков в навеске (C), мг/мл	Масса белков в навеске (M=C·V), мг	Концентрация белков в навеске, % $\left(\frac{M \cdot 100}{H \cdot 1000}\right), \%$
	сырого	сухого		280 нм (E ₂₈₀)	260 нм (E ₂₆₀)			

1
2
3
4

Колориметрический метод. Анализ начинают с построения калибровочного графика, для чего используют растворы альбумина или казеина.

На аналитических весах отвешивают 1 г казеина и вносят в мерную колбу на 100 мл через воронку для сыпучих веществ, приливают раствор буфера с рН 10 ($\frac{2}{3}$ объема колбы). Колбу плотно закрывают и встряхивают на ротаторе до полного растворения казеина. Затем колбу вынимают из ротатора, содержимое ее доводят буфером до метки, тщательно перемешивают несколько раз, после чего стандартный раствор белка можно считать готовым. В 1 мл такого раствора содержится 10 мг белка. Из рабочего стандартного раствора готовят производные растворы с содержанием белка от 0,1 до 2 мг, или шкалу (табл. 50).

50. Приготовление шкалы раствора

Номер колбы	Объем колбы, мл	Стандартный раствор казеина, мл	Боратный буфер с рН 10, мл	Концентрация белка, мг/мл
1	100	1	99	0,1
2	100	3	97	0,3
3	100	5	95	0,5
4	100	10	90	1,0
5	100	15	85	1,5
6	100	20	80	2,0

Пипеткой соответствующего объема берут необходимое количество стандартного раствора белка и переносят в пустую колбу на 100 мл, на которой заранее написан номер. Содержимое доводят буферным раствором до метки и перемешивают. Чтобы шкалой можно было

пользоваться длительное время, в колбы с раствором вносят по одной-две капли антисептика (толуола, каприловой кислоты).

Шкалу и исследуемые растворы окрашивают в градуированных пробирках на 10 мл. В пробирки с номерами по порядку (для шкалы номера — с первого по шестой, далее нумеруют пробирки с исследуемыми растворами) из соответствующих колб наливают по 1 мл раствора белков, добавляют 4 мл биуретового реактива. Содержимое каждой пробирки осторожно перемешивают встряхиванием и оставляют при комнатной температуре на 30 мин, после чего колориметрируют на спектрофотометре СФ-26, «Спеколе» или фотоэлектроколориметре ФЭК-60 при 540 нм.

Данные, полученные для стандартных растворов, изображают графически. На оси ординат откладывают величины светопоглощения белковых растворов (E), а на оси абсцисс — концентрацию белка (мг/мл), которая соответствует данному светопоглощению. Пользуясь калибровочной кривой, по величинам оптической плотности исследуемых растворов находят соответствующее количество белка. Рассчитывают общее содержание белков в семенах исследуемых культур в процессе их прорастания. Результаты записывают по форме (табл. 51).

51. Определение содержания белков

Номер пробирки	Навеска растительного материала (H), г		Объем экстракта белков (V), мл	Светопоглощение при 540 нм	Концентрация белка (C), мг/мл	Масса белка ($M=CV$), мг	Концентрация белка $\left(\frac{M \cdot 100 \%}{H \cdot 1000}\right), \%$
	сырого	сухого					

Шкала растворов

1	100	0,1
2	100	0,3
3	100	0,5
4	100	1,0
5	100	1,5
6	100	2,0

Исследуемые растворы

7
8
9
10

Материалы и оборудование. 1. Проросшие семена гороха, фасоли, пшеницы или ржи, боратный буфер с pH 10, содержащий 0,2 % бисульфита натрия; октиловый спирт; кварцевый песок.

Фарфоровые ступки с пестиками, центрифужные пробирки на 20 и 60 мл, резиновые пробки, мерные цилиндры на 10 и 25 мл, пипетки на 20 мл, мерные колбы на 100 мл, центрифуга типа LZ-402, К-24, спектрофотометр.

2. Проросшие семена гороха, фасоли, пшеницы или ржи, боратный буфер с pH 10,0, казеин или альбумин, биуретовый реактив (0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 50 мл H_2O , затем при активном перемешивании приливают 30 мл 10 %-го раствора NaOH и 0,1 г KI, раствор доводят водой до 100 мл), толуол или каприловая кислота.

Пипетки на 1, 10 (с делениями), 15 и 20 мл, мерные колбы на 100 мл, пробирки с делениями на 10 мл, спектрофотометры СФ-26, «Спекол» или ФЭК-60.

Работа 65. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕИНАЗ В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ

Вводные пояснения. Запасные белки расщепляются при участии протеиназ. Активность последних возрастает по мере набухания и прорастания семян, а после уменьшения количества белков в эндосперме (и на определенном этапе в семядолях у двудольных) вновь снижается. Известно несколько сотен протеиназ, которые сгруппированы в классы: сериновые, тиоловые, карбоксильные, металлопротеиназы, аминопептидазы. В каждом классе выделены соответствующие семейства протеиназ. Все протеиназы представляют собой гидролитические ферменты, т. е. расщепляют пептидные связи с участием воды.

Протеиназы, присутствующие в прорастающих семенах, органоспецифичны. Предполагается существование механизма регуляции, обеспечивающего их своевременное действие. Кроме того, видимо, есть протеиназы, активирующие некоторые другие гидролитические ферменты, а также протеиназы, участвующие в обычном кругообороте внутриклеточных белков. Из множества протеолитических ферментов в семенах лишь некоторые участвуют в процессе гидролиза запасных белков при прорастании.

В основу определения суммарной активности протеиназ положен метод, разработанный Ансеном и заключающийся в том, что ферментным препаратом, выделенным из растительного материала (семядолей прорастающих семян гороха, фасоли, бобов или прорастающих зерновок пшеницы и ржи), действуют на раствор како-

го-либо очищенного белка (казеина, альбумина, гемоглобина). Ферментную активность определяют по количеству высвободившихся из белков ароматических аминокислот (тирозина, триптофана) после удаления из раствора непрореагировавших с протениназами белков и ферментного препарата.

Количество ароматических аминокислот, содержащихся в низкомолекулярных белках, пептидах и в свободном состоянии, определяют колориметрически с реактивом Фолина или на спектрофотометре при 280 нм. Принято считать (с определенной степенью условности), что активность протениназ пропорциональна содержанию в растворе ароматических аминокислот.

Свойства белков, положенные в основу данного метода, служат хорошей иллюстрацией групповой специфичности протениназ, заключающейся в том, что фермент катализирует расщепление определенных химических связей в отдельных группах близких по строению веществ (протениназы растений гидролизуют и белок животного происхождения).

Порядок работы. Подготовительные операции. *Выделение протениназ.* Взвешивают 4..5 г сырых семян или зерновок (навеска сухого материала около 1 г), помещают в ступку, добавляют немного кварцевого песка и тщательно растирают. Приливают 5 мл дистиллированной воды и продолжают растирание до получения мелкодисперсной гомогенной кашицы. Навеску количественно переносят в мерную колбу на 50 мл, ополаскивая пестик и ступку небольшими порциями воды. Объем жидкости в колбе доводят до 50 мл, суспензию перемешивают и оставляют настаиваться в течение 1 ч (периодически перемешивая) при 2..5 °С.

Затем содержимое колбы переносят в центрифужные пробирки (две пробирки по 20 мл), уравнивают их и вытяжку центрифугируют на рефрижераторной центрифуге 30 мин при 8000..10000 g. После этого надосадочную жидкость сливают в чистую колбу (препарат протениназ) с притертой пробкой и при необходимости ставят в холодильник. Работу по определению активности протениназ лучше проводить со свежим препаратом.

Приготовление растворов субстратов. В качестве субстратов для определения активности растительных протениназ используют 2 %-е растворы химически чистых

препаратов казеина, альбумина или гемоглобина. Протеолитическая активность ферментов в семядолях двухдольных и зерновках злаков обусловлена действием нескльких протеиназ, специфичных для каждого вида растений. Для функционирования отдельно взятой протеиназы необходимы специфические условия, в том числе и определенная реакция среды. Поэтому активность растительных протеиназ определяют при одинаковых температурном режиме и соотношении субстрат:фермент по массе, но при различных значениях рН.

Пример 1. Взвешивают 2 г порошка казеина, помещают в мерную колбу на 100 мл, приливают небольшими порциями, ополаскивая стенки воронки и горлышка колбы, около 80 мл 0,2 М фосфатного буфера с рН 8. Для растворения навески колбу ставят на водяную баню, нагретую до 30...40 °С. После растворения казеина содержимое колбы доводят буферным раствором до метки и тщательно перемешивают. Затем в отдельный стаканчик отливают 10 мл раствора и в нем проверяют рН. При необходимости доведения рН до заданной величины добавляют при интенсивном перемешивании несколько капель 1 н. NaOH или 1 н. HCl (по каплям). Затраченное количество щелочи или кислоты учитывается, и соответствующее их количество вносят в раствор казеина, оставшийся в колбе. Раствор субстрата. вновь перемешивают.

Пример 2. Помешают 2 г порошка гемоглобина в фарфоровую ступку, приливают около 10 мл воды и тщательно растирают, строго следя, чтобы не было комочков и часть белка не осталась на стенках ступки и головке пестика. Затем раствор количественно переносят в стаканчик на 50 мл. Небольшой порцией воды ополаскивают ступку, пестик. Раствор гемоглобина в стаканчике подкисляют 0,3 н. HCl до рН 3,0, количественно переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят содержимое колбы до метки водой и тщательно перемешивают.

Пример 3. Помешают 2,2 г порошка гемоглобина в колбу на 150 мл и заливают 100 мл $1/15$ М фосфатного буфера с рН 6. Колбу плотно закрывают пробкой и ставят в ротатор для взбалтывания и растворения содержимого. После того как гемоглобин растворится (через 15...20 мин), колбу снимают с ротатора, вынимают пробку, в раствор вносят 36 г мочевины и оставляют при комнатной температуре на 30...40 мин, периодически перемешивая. После растворения мочевины в отдельно взятой пробе проверяют рН и при необходимости доводят до рН 6 растворами 1 н. NaOH или 1 н. HCl.

Результаты записывают по форме (табл. 52).

Определение активности протеиназ. В центрифужные пробирки на 10 мл, пронумерованные по порядку, наливают по 2 мл растворов субстратов: казеина с рН 8 и гемоглобина с рН 3 и рН 6, после чего пробирки помещают на 1...2 мин на водяную баню, предварительно нагретую до 30 °С. Когда раст-

52. Определение активности протеиназ

Номер пробирки	Навеска субстрата (А), препарата ферментов (Б), г	Биологический материал	Объем раствора (V), мл	pH
Субстраты				
1	2,0	Казеин	100	8,0
2	2,0	Гемоглобин	100	3,0
3	2,2	То же	100	6,0
Ферментативные препараты				
4			50	
5			50	
6			50	
7			50	

вор субстрата примет температуру бани, в пробирки вносят по 2 мл ферментного препарата, полученного из семян той или иной культуры в соответствии с заданием преподавателя. Реакция гидролиза белков идет 30 мин при 30 °С. Для равномерного прогревания содержимого пробирки периодически осторожно встряхивают.

Через 30 мин действие протеиназ останавливают добавлением в реакционную смесь 4 мл 10 %-го раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУК).

В трех пробирках готовят контрольные образцы. Для этого в них вносят по 2 мл соответствующих растворов субстратов (растворы казеина и гемоглобина с различными pH) и помещают на водяную баню. Через 1...2 мин добавляют по 2 мл ферментативного препарата, встряхивают и вслед за этим в каждую приливают по 4 мл 10 %-го раствора ТХУК. Все остальные операции проводят, как и в опытных вариантах.

Пробирки с опытными растворами встряхивают и оставляют на водяной бане еще 30 мин для более полного осаждения непрореагировавших с протеиназами белков и самих ферментов. Пробирки снимают с водяной бани, осторожно насухо вытирают и уравнивают на рычажных лабораторных весах, добавляя при необходимости в более легкие несколько капель 5 %-го раствора ТХУК. Затем пробирки помещают в ротатор центрифуги, центрифугируют 15 мин, ставят в штатив и приступают к спектрофотометрированию надосадочной жидкости. Параллельно определяют содержание белков в кол-

бе, где находится ферментный препарат (так же, как суммарные белки в растительном материале). В качестве эталонного раствора берут дистиллированную воду.

Пример 4. В кварцевую кювету спектрофотометра наливают $\frac{2}{3}$ объема надосадочной жидкости контрольного образца и ставят в гнездо 1 кюветодержателя. В гнезда 2, 3 и 4 помещают кюветы с исследуемыми растворами. Следят, чтобы не произошло путаницы, и если субстратом служил раствор гемоглобина с заданным рН, то при расчетах учитывают светопоглощение этого же раствора (контроль). Кюветодержатель помещают в кюветную камеру, закрывают крышку и делают отсчеты по шкале прибора светопоглощения (E) всех растворов поочередно при 280 нм.

Данные записывают по форме (табл. 53).

53. Определение активности протеиназ

Номер опыта	Субстрат	Объект исследования	E_{280}	Активность протеиназ	
				единиц АП на 1 мг белка за 1 ч	единиц АП на 1 мг навески за 1 ч
1	Казеин, рН 8 Гемоглобин, рН 6 Гемоглобин, рН 3				
Контроль	Казеин, рН 8 Гемоглобин, рН 6 Гемоглобин, рН 3				
2	Казеин, рН 8 Гемоглобин, рН 6 Гемоглобин, рН 3				
Контроль	Казеин, рН 8 Гемоглобин, рН 6 Гемоглобин, рН 3				

Активность протеиназ в условных единицах на 1 г навески за 1 ч или в условных единицах на 1 мг белка за 1 ч рассчитывают по формуле

$$АП = \frac{(E_o - E_k) 2}{A_1 \text{ (или } B_1) },$$

где E_k и E_o — светопоглощение контрольного и опытного образцов; A_1 — навеска материала, соответствующая количеству ферментного препарата, взятого для определения $\left(A_1 = \frac{A \cdot 2}{50} \right)$, где A — навеска материала, взятая для анализа, г; B_1 — содержание

белка в препарате $\left(B_1 = \frac{B \cdot 2 \cdot 1000}{100} \right)$, где B — навеска казеина или гемоглобина, г), мг; 2 — коэффициент пересчета на 1 ч.

Материалы и оборудование. Проросшие семена гороха, фасоли, пшеницы или ржи, казеин, гемоглобин, 0,2 М фосфатный буфер с рН 8, $\frac{1}{15}$ М фосфатный буфер с рН 6; растворы 0,3 н. HCl, 1 н. NaOH, 5 %-й и 10 %-й ТХУК, 1 н. HCl; мочевины.

Фарфоровые ступки с пестиками, воронки для сыпучих веществ, мерные колбы на 50 и 100 мл, пипетки с делениями на 2 и 5 мл, центрифужные пробирки на 20 мл, ротатор, центрифуга, спектрофотометр СФ-26 (СФ-16, СФ-4).

Работа 66. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАПАСНОГО КРАХМАЛА В СЕМЕНАХ ПО ПОЧИНКУ

Вводные пояснения. В семенах и плодах многих сельскохозяйственных культур углеводы в основном запасаются в виде крахмала. Крахмал — полисахарид, состоящий из амилазы и амилопектина, которые также являются полисахаридами, но обладают меньшей молекулярной массой и отличаются друг от друга по физическим и химическим свойствам.

Объемный метод по Починку включает следующие операции: экстракцию крахмала; осаждение крахмала в виде комплексного соединения с йодом; окисление комплекса бихроматом калия в кислой среде (при этом выделяется углекислый газ и вода); разрушение избытка бихромата калия раствором KI (в качестве одного из продуктов реакции выделяется йод); титрование йода гипосульфитом натрия. Содержание крахмала рассчитывают по количеству затраченного при титровании гипосульфита натрия.

Порядок работы. Экстракция крахмала из растительного материала. На аналитических весах взвешивают 300 мг высушенных зерновок пшеницы или семядолей гороха, отобранных в различные периоды их формирования, помещают в фарфоровую ступку, приливают 5 мл 80 %-го раствора $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и тщательно растирают. Если материал растирается плохо, добавляют немного прокаленного кварцевого песка. В среднем на операцию растирания навески затрачивают 8...10 мин. После этого содержимое ступки количественно переносят в коническую колбу на 150 мл, отмывая каждый раз небольшими порциями ступку и пестик. Необходимо следить за тем, чтобы объем экст-

ракта в колбе не превышал 30 мл. Затем ее накрывают маленькой воронкой, ставят на электроплитку с закрытой спиралью, снабженную терморегулятором, и не очень сильно кипятят в течение 3 мин. Затем колбу снимают с плитки и оставляют при комнатной температуре для охлаждения. После этого экстракт крахмала количественно переносят в мерную колбу на 100 мл, а коническую колбу несколько раз ополаскивают 80 %-м раствором $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, каждый раз сливая промывной раствор в мерную колбу. Затем содержимое мерной колбы доводят до метки этим же раствором, плотно закрывают и несколько раз перемешивают. Перед следующей операцией раствор крахмала фильтруют через складчатый фильтр (белая лента).

Осаждение крахмала из раствора. Две порции фильтрата объемом по 5 мл каждая помещают в центрифужные пробирки на 10 мл. В каждую из пробирок вносят по 2 мл 0,5 %-го раствора йода в йодиде калия, содержимое перемешивают стеклянной палочкой и пробирки оставляют при комнатной температуре на 30 мин. За это время выпадает осадок, который представляет собой комплекс крахмала и йода. Следующая операция — омывание осадка. Из пробирок вынимают стеклянные палочки, пробирки уравнивают между собой, помещают в центрифугу и центрифугируют в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отбрасывают, а осадок еще три раза промывают 5 %-м раствором $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, добавляя его по 5 мл и взмучивая после этого осадок стеклянной палочкой. Надосадочную жидкость после каждого центрифугирования отбрасывают.

Окисление комплекса крахмал — йод. Промытые осадки комплекса крахмала с йодом количественно переносят в конические колбы на 200 мл, каждый раз оmyвая пробирки небольшим количеством воды.

Объем водной суспензии в конической колбе не должен превышать 3 мл. Затем в каждую колбу приливают по 10 мл 0,25 н. раствора $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, растворенного в 85 %-м растворе серной кислоты, содержимое колб перемешивают и сразу помещают на кипящую водяную баню на 15 мин для окисления комплекса.

Разрушение избытка бихромата калия. Через 15 мин колбы снимают с бани и охлаждают, затем наливают в каждую по 5 мл 20 %-го раствора KI

и 120 мл воды и осторожно перемешивают. В результате разложения бихромата в раствор выделяется йод.

Титрование йода. Выделившийся йод оттитровывают 0,1 н. раствором тиосульфата натрия (гипосульфита). Титровать лучше с использованием магнитной мешалки. Скорость добавления раствора тиосульфата натрия — 25...30 капель в 1 мин. Сначала титрование ведут до появления желтой окраски, затем в колбы приливают по 1 мл 0,5 %-го раствора крахмала и титруют до перехода интенсивной сине-голубой окраски в бледно-голубую. При расчете учитывают, что 1 мл 0,1 н. раствора тиосульфата натрия соответствует 0,675 мг крахмала.

Проводят контрольное определение количества тиосульфата натрия, затрачиваемого на связывание йода, который выделяется в период разрушения бихромата калия. Для этого в коническую колбу на 200 мл наливают 120 мл воды, 10 мл 0,25 н. раствора $K_2Cr_2O_7$ и 5 мл 20 %-го раствора KI. В колбу опускают якорь магнитной мешалки, содержимое перемешивают и титруют 0,1 н. раствором тиосульфата натрия, как и исследуемые растворы. Содержание крахмала в исследуемом образце, %, рассчитывают по формуле

$$C = \frac{0,675 \cdot VT(a - a_1)100}{V_1H}$$

где a и a_1 — объем 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, затраченного на титрование контрольного и исследуемого растворов, мл; V — объем раствора, в котором растворена навеска исследуемого объекта, мл; V_1 — объем раствора, взятого для осаждения крахмала, мл; T — поправка к титру 0,1 н. раствора тиосульфата натрия; H — навеска растительного материала, г.

54. Определение содержания крахмала

Номер колбы	Объект исследования	Навеска материала (H), г	Исходный объем экстракта крахмала (V), мл	Объем экстракта, взятый для осаждения крахмала (V_1), мл	Израсходовано раствора тиосульфата натрия, мл		Содержание крахмала (C), %
					на контрольный образец (a)	на исследуемый образец (a_1)	

1
2
3
4

Результаты записывают по форме (табл. 54).

Материалы и оборудование. Семена пшеницы, ячменя и гороха (фасоли), отобранные на разных стадиях спелости; 80 %-й раствор $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,5 %-й раствор йода в KI; 5 %-й раствор $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,25 н. раствор $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ в 85 %-м растворе H_2SO_4 ; 20 %-й раствор KI; 0,1 н. раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 0,5 %-й раствор крахмала; кварцевый песок.

Аналитические весы, фарфоровые ступки с пестиками, конические колбы на 150 и 200 мл, маленькие фильтровальные воронки, электроплитка с закрытой спиралью и терморегулятором, мерные колбы на 100 мл, фильтры (белая лента), воронки для фильтрации; пипетки на 5 мл с делениями, стеклянные палочки, центрифужные пробирки на 10 мл, мерные цилиндры на 25 и 100 мл, водяная баня, магнитная мешалка, центрифуга.

Работа 67. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗ В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ

Вводные пояснения. В процессе прорастания семян в результате гидролиза и фосфоролиза крахмал распадается на более простые соединения. Гидролитический распад запасного крахмала может протекать при участии четырех видов гидролаз: α -амилазы, β -амилазы, глюкоамилазы и амилопектин-1,6-глюкозидазы. Фосфоролитический распад запасного крахмала осуществляется ферментом α -глюканфосфорилазой. По мере набухания сухих семян в период прорастания возрастает активность гидролитических ферментов, при этом содержание крахмала падает, а сахаров возрастает.

Определение суммарной активности амилаз включает выделение амилаз раствором NaCl, инкубацию их со стандартным раствором крахмала в течение заданного промежутка времени и, наконец, колориметрическое определение негидролизованного амилазами остаточного крахмала. Активность амилаз выражается в миллиграммах гидролизованного крахмала за 1 ч на 1 мл раствора ферментов или в миллиграммах гидролизованного крахмала на 1 мг белка за 1 ч (удельная активность).

Порядок работы. Выделение амилаз. Взвешивают 4 г проросших семян пшеницы, ячменя или гороха, помещают в фарфоровую ступку, добавляют немного промытого и прокаленного кварцевого песка, 10 мл 1 %-го раствора NaCl и тщательно растирают до получения однообразной мелкодисперсной кашицы. Добавляют еще 5 мл раствора NaCl и продолжают растирание.

Затем смазывают нижнюю часть носика ступки вазелином и суспензию количественно переносят в центрифужную пробирку на 50 мл. Ступку и пестик несколько раз ополаскивают небольшими порциями раствора NaCl, следя за тем, чтобы объем суспензии в пробирке не превысил 40...45 мл. В пробирку помещают стеклянную палочку и содержимое тщательно перемешивают, после чего оставляют на 1 ч в холодильнике (каждые 15 мин перемешивают). Затем пробирку вынимают из холодильника, вытаскивают стеклянную палочку, все пробирки с исследуемыми ферментными препаратами уравнивают между собой, помещают в гнезда ротатора центрифуги и центрифугируют в течение 15 мин. Надосадочную жидкость (препарат амилаз) осторожно сливают в чистую сухую колбу, закрывают и при необходимости помещают в холодильник.

Приготовление субстрата. Активность амилаз, выделенных из того или иного растительного объекта, определяют при помощи специально приготовленных растворов чистого крахмала заданной концентрации. В две градуированные на 10 мл чистые сухие пробирки вносят по 3 мл 0,2 н. ацетатного буфера с pH 5,5 и по 3 мл 2 %-го раствора крахмала. При серийных определениях пробирки, заполненные забуференным раствором крахмала, можно заготовить сразу на всю серию. Осторожным легким встряхиванием содержимое пробирок перемешивают.

Заготовленные пробирки ставят на водяную баню, заранее нагретую до 40 °C. По достижении субстратом температуры бани (проверяют по контрольной пробирке, в которую вставлен термометр) в пробирки приливают по 0,5 мл ферментного препарата, смесь осторожно перемешивают. В серии обязательно должна быть контрольная пробирка, которая содержит все те компоненты, что и остальные, но вместо препарата ферментов в нее вносят 0,5 мл воды. Пробирки вновь помещают на 30 мин на водяную баню, нагретую до 40 °C.

Если есть термостат, пробирки с реакционной смесью лучше поместить в него. Через 30 мин инкубирования в реакционную смесь каждой пробирки для остановки реакции вносят по 2 мл 1 н. раствора HCl, содержащее их перемешивают. Затем из каждой пробирки берут по 0,5 мл смеси и вносят в мерные колбы на 50 мл, которые заранее до половины заполнены водой и в них

внесено по 1 мл 0,1 н. раствора HCl и по 5 капель 0,3 %-го раствора йода в 3 %-м растворе KI. Колбы доводят до метки водой, закрывают и хорошо перемешивают содержимое.

Окрашивание смеси лучше проводить во времени с интервалами 3 мин, стремясь к тому, чтобы период от начала окрашивания до спектрофотометрирования (колориметрирования) для каждой колбы был примерно одинаковым (в среднем 3 мин). Спектрофотометрирование окрашенных растворов выполняют при 595 нм (фотоэлектроколориметрирование — при красном светофилтре).

Активность амилаз (в 1 мг гидролизованного крахмала за 1 ч на 1 мл ферментативного раствора) рассчитывают по формуле

$$AA = \frac{E_K - E_0}{E_K} \cdot \frac{2 \cdot 2}{60},$$

где E_K и E_0 — светопоглощение контрольного и опытного растворов, единиц шкалы прибора; 2 и 2 — пересчетные коэффициенты на 1 ч и 1 мл ферментного раствора; 60 — пересчетный коэффициент на 1 мг крахмала (3 мл и 2 %-го раствора соответствуют 60 мг).

Полученные данные записывают по форме (табл. 55).

55. Определение активности амилазы (AA)

Номер пробирки	Объект исследо- вания	Навеска материала, г	Объем препарата амилаз, мл	Объем раствора субстрата, мл	E_{595}	AA
-------------------	-----------------------------	----------------------------	-------------------------------------	---------------------------------------	-----------	----

1
2
3
4

Материалы и оборудование. Проросшие семена пшеницы, ячменя и гороха, 1 %-й раствор NaCl; 0,2 н. ацетатный буфер с рН 5,5; 2 %-й раствор крахмала; 1 н. раствор HCl, 0,1 н. раствор HCl.

Фарфоровые ступки с пестиками, кварцевый песок; центрифужные пробирки на 50 мл; градуированные пробирки на 10 мл; мерные цилиндры на 25 мл; градуированные пипетки на 1 и 5 мл; аналитические и лабораторные весы; водяная баня или термостат; мерные колбы на 50 мл; конические колбы на 100 мл; центрифуга; спектрофотометр (СФ-26, «Спекол», ФЭК-60); фотоэлектроколориметр (ФЭК-56М).

**Работа 68. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЖИРОВ
РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ**

Вводные пояснения. Жиры выполняют функцию запасных высокоэнергетических веществ, откладывающихся в плодах и семенах. Они представляют собой смесь сложных эфиров глицерина и высокомолекулярных жирных кислот.

При прорастании семян одна часть запасных жиров используется на дыхание, а другая — в реакциях обмена веществ превращается в углеводы и передвигается к точкам роста. Снижение содержания жиров в зародыше, эндосперме и семядолях сопровождается и изменением состава свободных жирных кислот. Превращение жиров идет в присутствии ферментов, активность которых увеличивается при прорастании семян. Повышение активности липазы по мере прорастания семян обеспечивает гидролиз триглицеридов до диглицеридов, моноглицеридов, а затем до жирных кислот и глицерина.

Методы извлечения жиров из растительных объектов основаны на способности этих веществ растворяться в неполярных растворителях. Существенным недостатком данного подхода представляется то обстоятельство, что, кроме жиров, в неполярных органических растворителях растворяются липоиды, эфирные масла, пигменты, фосфатиды и т. п. Поэтому жиры, извлекаемые органическими растворителями, называют сырыми.

Извлечение сырых жиров из исследуемых растительных объектов выполняют при помощи нелетучего органического растворителя, а затем определяют показатель преломления извлеченного раствора жиров и растворителя, которые значительно различаются между собой. Концентрацию жиров в исследуемом объекте рассчитывают по разности коэффициентов преломления. В качестве растворителей жиров семян берут бромнафталин и хлорнафталин.

Порядок работы. Подготовка растительного материала и экстракция жиров. Отобранные на разных стадиях формирования семена подсолнечника освобождают от семенной оболочки и подсушивают в сушильном шкафу при 130 °С в течение 30...40 мин до влажности не более 4 %. Затем семена охлаждают до 40...50 °С, размалывают на ударной мельнице, а муку помещают в эксикатор, где хранят в

бюксах над прокаленным MgSO_4 или CaCl_2 до начала работы.

Отвешивают 5 г муки из семян подсолнечника разных фаз спелости. Навеску помещают в фарфоровую ступку, добавляют 2...3 г прокаленного кварцевого песка и приливают 5 мл хлорнафталина. Смесь тщательно растирают 3...4 мин, затем добавляют еще 15 мл растворителя и продолжают растирание, пока не получится однообразная мелкодисперсная каша (весь этап растирания длится 8...10 мин). Перед рефрактометрированием суспензию фильтруют. Для этого берут чистую сухую коническую колбу, в которую вставляют воронку со складчатым бумажным фильтром. Суспензию из ступки переносят большими порциями на фильтр. Первые две-три капли фильтрата можно отбросить.

Определение содержания жироев. Определение ведут на жировом рефрактометре (РЖ). Для этого барабан штутцера рефрактометра переводят в положение «1» и отсчеты делают по шкале. Затем открыв камеру рефрактометра, равномерно наносят оплавленной стеклянной палочкой на одну часть измерительной призмы четыре-пять капель профильтрованного раствора жироев. Капли должны быть средних размеров. Смешивание двух компонентов вызовет нерезкую и неравномерно окрашенную границу светотени. Если компоненты смешались, определение повторяют, уменьшив размер наносимых капель. Далее верхнюю часть камеры плавно закрывают до соприкосновения с нижней камерой. Лимб нониуса устанавливают на нуль и, наблюдая в окуляр, направляют луч осветителя на выходную грань осветительной призмы (на ее правую или левую часть).

В поле зрения появляются две границы светотени: нижняя, близкая к показателю преломления растворителя, и верхняя, близкая к показателю преломления раствора. Необходимо установить осветитель так, чтобы была видна одна граница светотени. Поворотом кольца монохроматора устраняют дисперсию, добиваясь обесцвечивания границы светотени. Резкость и видимость границы светотени улучшают передвижением осветителя и диафрагмы, находящихся впереди осветительного окна.

Затем по шкале 1 делают отсчеты. Если граница светотени находится между двумя любыми делениями

шкалы, то вращением лимба нониуса против часовой стрелки доводят границу светотени до ближайшего верхнего деления. Показатель преломления определяют по шкале с точностью до 0,0002, а по нониусу — до 0,00002. Одно деление нониуса равно 0,00002. Установив лимб нониуса снова на нуль, осветитель перемещают горизонтально до получения второй резкой границы светотени и, устранив дисперсию, делают отсчет. Перед новым определением тщательно протирают измерительную и осветительную призмы этиловым эфиром, а затем сухой ватой.

Показатели преломления растворителя и раствора определяют три раза и за конечный результат берут среднее значение. Содержание жира (%) вычисляют по формуле

$$C = (a + b\Delta_{ж})\Delta_{ж},$$

где a — коэффициент, показывающий, сколько жира приходится на отсчет 0,0001 при данном растворителе, %; b — постоянная величина для растворителя (хлорнафталина), равная 16 900; $\Delta_{ж}$ — разность между показателями преломления растворителя и раствора.

Данные опыта записывают по форме (табл. 56).

56. Определение содержания жиров

Номер опре- деления	Объект иссле- дова- ния	Навес- ка ма- териала (H), г	Показатель преломления по шкале			Концен- трация жиров (C), %	Содержа- ние жиров в навеске $\left(\frac{H \cdot C}{100\%}\right)$, г
			для раст- ворителя (Δ_p)	для раствора ($\Delta_{рж}$)	разность ($\Delta_{ж}$)		
1							
2							
3							
4							

Материалы и оборудование. Семена подсолнечника разной степени спелости, хлорнафталин.

Фарфоровые ступки с пестиками, кварцевый песок, бюретки на 25 мл, фильтровальная бумага, воронки для фильтрования, конические колбы на 50 мл, весы лабораторные, мельница лабораторная ударная (кофемолка), рефрактометр жировой (РЖ).

Работа 69. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗ В ПРОЦЕССЕ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН

Вводные пояснения. При прорастании семян масличных растений, отличающихся высоким содержанием тригли-

церидов, быстро уменьшается содержание жиров и одновременно увеличивается концентрация сахарозы. Образование углеводов из жиров — многоэтапный процесс, четко разграниченный в пространстве и во времени. С момента начала набухания семян масличных культур первым ферментом, действующим на молекулу жира (триглицерид), служит нейтральная липаза. Установлено, например, что в семенах клещевины липаза активируется одной из протенназ, присутствующих в эндосперме. Липаза ступенчато гидролизует триглицерид до диглицерида, моноглицерида и, наконец, до свободного глицерина и жирных кислот.

Липазы, присутствующие в семенах масличных растений, проявляют активность при различных значениях рН. Поэтому иногда употребляют названия нейтральной, кислой и щелочной липазы. Наиболее активны в семенах масличных кислая и щелочная липазы. Определение их активности основано на учете концентраций жирных кислот, образующихся при действии на чистый препарат какого-либо жира (масла) экстрактом липаз, выделенным из семян разных периодов прорастивания.

Порядок работы. Две навески очищенных от кожуры прорастающих семян подсолнечника (по 3 г каждая) помещают в фарфоровые ступки, приливают по 1 мл чистого подсолнечного масла и тщательно растирают в течение 3...4 мин. Затем в одну из ступок приливают 5 мл ацетатного буфера с рН 4,7, а в другую — 5 мл боратного буфера с рН 8,5, продолжают растирание еще 2 мин. Затем содержимое ступок количественно переносят в две конические колбы на 100 мл. Ступку и пестик ополаскивают 5 мл воды, сливая промывные воды в соответствующую колбу, добавляют по пять капель толуола, колбы плотно закрывают пробками и ставят на ротатор, где перемешивают в течение 30 мин. После этого колбы ставят на 20 ч в термостат при 30 °С.

Одновременно готовят две контрольные колбы (для каждого рН), с которыми продельвают те же операции, что и при исследовании образцов, однако перед помещением контрольных колб в термостат их содержимое кипятят 5...10 мин на электроплитке для инактивации липаз.

Через 20 ч (на следующий день) колбы вынимают из термостата, приливают в каждую из них по 50 мл смеси этилового спирта с эфиром в соотношении 4:1,

встряхивают и дают несколько минут отстояться. Далее добавляют по четыре-пять капель тимолфталейна и содержимое колб титруют 0,1 н. спиртовым раствором NaOH. Активность кислых и щелочных липаз выражают в миллилитрах 0,1 н. спиртового раствора NaOH, пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся в результате действия липаз на 1 г семян. Расчет активности липазы (кислой или щелочной) ведут по формуле

$$АЛ = \frac{(aT - bT)}{H},$$

где a и b — количества 0,1 н. спиртового раствора NaOH, затраченного на титрование опытного и контрольного образцов, мл; T — поправка к титру 0,1 н. раствора NaOH; H — навеска семян, г.

Данные записывают по форме (табл. 57).

57. Определение активности липаз

Номер колбы	Объект исследования, рН	Навеска материала (H), г	Пошло на титрование 0,1 н. раствора NaOH, мл		Активность липазы (АЛ), мл (0,1 н. раствора NaOH, г)
			исследуемого раствора (a)	контрольного раствора (b)	

1
2
3
4

Материалы и оборудование. Семена подсолнечника, отобранные в различные периоды прорастания; ацетатный буфер с рН 4,7; боратный буфер с рН 8,5; подсолнечное масло; 0,1 н. спиртовой раствор NaOH; смесь этилового спирта с эфиром (4:1); толуол; 1 %-й спиртовой раствор тимолфталейна.

Фарфоровые ступки с пестиками, конические колбы на 100 мл, мерные цилиндры на 10 и 50 мл, ротатор, аналитические весы, термостат, электроплитка.

Глава 8

РОСТ И РАЗВИТИЕ

Рост и развитие растений — важнейшие физиологические процессы, определяющие структуру, величину и качество урожая. Поэтому агроном должен хорошо знать их, уметь исследовать и контролировать. Рост — необратимое увеличение размеров и массы тела, свя-

занное с новообразованием элементов структуры организма. Рост растения складывается из роста клеток, тканей и органов. Развитие — качественные изменения структуры и функций растения и его отдельных частей — органов, тканей и клеток, возникающие в процессе онтогенеза.

Все процессы роста и развития растений осуществляются через деление, растяжение и дифференциацию клеток. Рост в длину и ветвление побегов и корней происходят благодаря деятельности апикальных меристем верхушек побегов и кончиков корней; рост в толщину — в результате деятельности камбия. В период роста клетки меристем и камбия непрерывно делятся: внешняя часть клеток остается в меристемном состоянии, а все остальные растут и дифференцируются в ткани и органы. Следовательно, каждая клетка в процессе роста проходит три фазы: меристемную или эмбриональную; роста, или растяжения; дифференциации.

Меристемные клетки имеют тонкую пектоцеллюлозную оболочку, заполнены густой цитоплазмой и, как правило, не имеют вакуолей. В фазе растяжения клетки сильно увеличиваются в размерах главным образом благодаря поглощению воды и образованию крупных вакуолей, но при этом увеличивается также масса клеточной оболочки и цитоплазмы. Зона растяжения у корней составляет около 1 см, у стеблей — 5...10 см.

Еще в зоне растяжения клетки начинают дифференцироваться в ткани, но окончательная дифференциация и рост в толщину наблюдаются ниже этой зоны в стеблях и выше — в корнях.

Общий закон роста — его неравномерность, или периодичность, обусловленная внутренними причинами. Вначале рост органа или всего растения происходит медленно, затем быстрее и потом снова замедляется. Нарастание общей массы органа или растения графически выражают в виде плавной S-образной кривой, а скорость роста, или прирост массы, в виде плавной, более или менее симметричной кривой с одним максимумом.

К важному внутреннему фактору роста и развития растений относят вещества высокой физиологической активности, объединяемые под названием регуляторов роста и развития. Это ауксины, гиббереллины, цитокинины и ингибиторы роста. Поскольку указанные веществ-

ва образуются в одних тканях и органах растения и, передвигаясь, действуют на другие ткани и органы, их называют также фитогормонами. В зависимости от физиологического состояния растения, концентрации и соотношения фитогормонов, последние могут стимулировать или тормозить тот или иной физиологический процесс, ускорять или замедлять его.

Синтезировано много искусственных регуляторов роста растений, которые широко применяют: для подавления развития сорняков; при укоренении черенков; для нарушения или вызывания состояния покоя растений; опадения листьев; ускорения опадения излишних завязей и предупреждения предуборочного опадения плодов, увеличения их размеров; получения партенокарпичных (бессемянных) плодов.

На рост и развитие растений влияют внешние факторы: интенсивность и спектральный состав света, продолжительность дня и ночи, температура и влажность воздуха и почвы, органические и минеральные удобрения.

Работа 70. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗОН РОСТА В ОРГАНАХ РАСТЕНИЙ

Вводные пояснения. Для изучения ростовых процессов широко применяют метод нанесения меток на поверхность органа через одинаковые расстояния. По мере роста органа расстояния между метками увеличиваются и могут быть использованы для характеристики интенсивности роста разных участков растущей зоны органа.

Метки наносят тушью (растирают сухую тушь в 5%-м растворе декстрина или альбумина) или маркировочной жидкостью, полученной из сажи или активированного угля и парафинового масла (сажу или активированный уголь растирают с парафиновым маслом до образования густой жидкости).

Для нанесения меток используют щетинку, привязанную к палочке, тонко заточенную деревянную палочку или нитку, смоченную тушью или маркировочной жидкостью.

Порядок работы. Определение зоны роста корня. Семена гороха или фасоли, конских бобов, кукурузы проращивают во влажных опилках, в которых стеклянной палочкой делают углубления для свободно-

го строго вертикального роста корня. Затем на небольшие длиной 1,5...2 см совершенно прямые предварительно осторожно обсушенные фильтровальной бумагой корни (три-четыре корня) наносят метки начиная от кончика. Расстояния между метками 1 мм. Метки должны быть тонкими и хорошо заметными. Далее проростки помещают в благоприятные для роста условия: влажные камеры, темные комнаты при 20...25°C. Через сутки измеряют расстояния между метками (при увеличении ширины самих меток измеряют от их середины) и вычисляют средний суточный прирост различных участков корня.

Результаты выражают графически, откладывая по оси абсцисс номера отрезков, а по оси ординат — приросты. Делают выводы о характере роста корня. Результаты опыта записывают по форме (табл. 58).

58. Форма записи результатов

Номер проростка	Зона прироста, мм									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

1
2
3
4

Продолжение

Номер проростка	Зона прироста, мм										Примечание
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	

1
2
3
4

Определение зоны роста стебля. Метод основан на учете приростов различных участков стебля за сутки. На четырех проростках подсолнечника высотой 2...3 см тушью наносят (начиная от верхушки проростка) по десять меток на расстоянии 2 мм друг от друга. Проростки помещают в темное место при 20...25°C. Через сутки измеряют расстояния между метками и вычисляют прирост различных участков стебля.

Результаты опыта записывают в тетрадь и выражают графически, откладывая по оси абсцисс порядковый номер метки, а по оси ординат — прирост. Делают выводы о характере роста стебля. Результаты опыта учитывают по форме, указанной при определении зоны роста корня.

Материалы и оборудование. Проростки гороха с корнями длиной 1,5...2 см, проростки подсолнечника высотой 2...3 см, выращенные в темноте, тушь или маркировочная жидкость, древесные опилки.

Препаровальные иглы или тонко заточенные деревянные палочки, миллиметровая бумага, влажные камеры.

Работа 71. НАБЛЮДЕНИЕ ЗА РОСТОМ ПРИ ПОМОЩИ ГОРИЗОНТАЛЬНОГО МИКРОСКОПА

Вводные пояснения. Метод основан на учете смещения нарастающего кончика корня в делениях окуляра-микрометра через определенные промежутки времени.

Порядок работы. На столике микроскопа укрепляют влажную камеру с проросшими семенами так, чтобы в поле зрения при малом увеличении был виден прямой кончик корня. Трубу микроскопа переводят в горизонтальное положение. Совмещают кончик корня с каким-либо делением шкалы окуляра-микрометра и отмечают смещение нарастающего кончика каждые 10 мин в течение 1 ч. Полученные данные выражают графически.

Результаты опыта учитывают по форме (табл. 59).

59. Наблюдение за ростом корня

Способ учета	Время наблюдения, мин					
	10	20	30	40	50	60

Отсчет в делениях окуляра-микрометра

Измерение прироста в делениях окуляра-микрометра

Материалы и оборудование. Влажные камеры с проросшими семенами льна.

Микроскопы, окуляры-микрометры.

Работа 72. НАБЛЮДЕНИЕ ПЕРИОДИЧНОСТИ РОСТА ДРЕВЕСНЫХ ПОБЕГОВ

Вводные пояснения. Побег растет неравномерно. В начале наблюдается медленный рост, затем скорость роста увеличивается, достигает максимума, снова замедляется, и, наконец, рост прекращается. Таким образом, наблюдается периодичность роста побега, которая характеризуется законом большого периода роста.

Периодичность роста проявляется в том, что междоузлия, образующиеся по мере нарастания побега, имеют неодинаковую длину. В большинстве случаев она увеличивается от основания к середине побега, где достигает максимума, а к верхушке побега опять уменьшается.

Порядок работы. Измеряют линейкой длину междоузлий побега какого-либо древесного растения. На основании полученных данных строят графики прироста междоузлий и побега. По оси ординат откладывают длину междоузлий и длину побега, по оси абсцисс — номера междоузлий, считая от основания побега. Делают вывод о периодичности роста побега.

Результаты измерений записывают по форме (табл. 60).

60. Наблюдения за ростом древесных побегов

Длина, см	Номер междоузлия от основания побега									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 и т. д.

Длина междоузлия

Длина побега

Материалы и оборудование. Побеги древесных пород, линейки.

Работа 73. ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ГЕТЕРОАУКСИНА* НА РОСТ КОРНЕЙ

Вводные пояснения. Метод заключается в проращивании семян на растворах гетероауксина различных концентраций и учете длины корешков.

* Временно до разработки и утверждения нормативов для рыбохозяйственных водоемов этот препарат запрещено применять в производстве.

Порядок работы. Пять чашек Петри - выстилают фильтровальной бумагой, увлажняют 9 мл воды или 0,01; 0,001; 0,0001 и 0,00001 %-ми растворами гетероауксина.

Для получения указанных концентраций 1 мл исходного 0,01 %-го раствора гетероауксина наливают в мерный цилиндр на 10 мл и доливают водой до черты, тщательно перемешивают; затем 9 мл помещают в чашку Петри, а оставшийся 1 мл снова доливают водой до черты и т. д.

На увлажненной фильтровальной бумаге раскладывают пять зерновок кукурузы или пшеницы, закрывают чашку Петри крышкой и помещают в темное место при 20..25 °С.

На следующем занятии (через неделю) измеряют длину корешков и делают вывод о задержке и стимулировании роста корней в зависимости от концентрации гетероауксина. Результаты измерений записывают по форме (табл. 61).

61. Влияние гетероауксина на рост корней

Вариант	Суммарная длина кореш- ков, см	Средняя длина корешков на одно расте- ние, см	Длина корешка, % контро- ля
---------	--------------------------------------	--	--------------------------------------

Водопроводная вода (конт-
роль)

Раствор гетероауксина, %:

0,01

0,001

0,0001

0,00001

Материалы и оборудование. Семена кукурузы или пшеницы, 0,01 %-й раствор гетероауксина.

Чашки Петри, пипетки на 1 мл, мерные цилиндры на 10 мл, фильтровальная бумага.

Работа 74. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕТЕРОАУКСИНА НА УКОРЕНЕНИЕ ЧЕРЕНКОВ ФАСОЛИ

Вводные пояснения. Гетероауксин вызывает усиленное образование корней у черенков травянистых (особенно фасоли) и древесных растений. На этом основано применение его в сельском хозяйстве для размножения черенков трудно укореняющихся растений.

Порядок работы. Берут десятидневные проростки фасоли высотой 11...13 см. Срезают у основания четыре одинаковых по высоте и общему развитию проростка, подрезают их под водой примерно на 1 см. Два проростка (контроль) помещают в стакан или колбу с водопроводной водой, два других (опыт) — в такую же посуду с 0,01 %-м раствором гетероауксина.

Через 3 ч черенки вынимают из раствора гетероауксина, ополаскивают их основания водопроводной водой, погружают в воду на глубину 4...5 см и оставляют на свету при температуре около 20 °С до образования корней. В конце опыта учитывают число возникших корней у черенков, обработанных гетероауксином, и контрольных. Делают вывод о действии гетероауксина. Результаты записывают по форме (табл. 62).

62. Влияние гетероауксина на укоренение черенков

Вариант	Число образовавшихся корешков	Стимулирование корнеобразования гетероауксином % контроля
---------	-------------------------------	--

Водопроводная вода (контроль)
0,01 %-й раствор гетероауксина

Материалы и оборудование. Десятидневные проростки фасоли, 0,01 %-й раствор гетероауксина.

Колбы конические на 200 мл, химические стаканы на 200 мл, ножницы, кристаллизатор.

Работа 75. ПРЕРЫВАНИЕ ПЕРИОДА ПОКОЯ У КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ПОМОЩИ ТИОМОЧЕВИНЫ

Порядок работы. Четыре-пять клубней, находящихся в состоянии покоя, заливают в одной стеклянной банке 1...2 %-м раствором тиомочевины, в другой — водопроводной водой и оставляют на 2...3 ч. Затем клубни высаживают во влажный песок в поддоны и помещают в теплицу при 20...25 °С. Отмечают начало прорастания опытных и контрольных клубней, делают вывод о значении обработки картофеля тиомочевинной.

Результаты опыта записывают по форме (табл. 63).

Материалы и оборудование. Клубни картофеля, 1...2 %-й раствор тиомочевины.

Кристаллизаторы или банки на 1 л, поддоны, кварцевый песок.

63. Влияние тиомочевины на прорастание клубней картофеля

Вариант	Число проросших клубней картофеля			Стимулирование прорастания тиомочевинной, % к контролю
	через одну неделю	через две недели	всего	

Водопроводная вода (контроль)
1...2 %-ный раствор тиомочевины

Работа 76. НАБЛЮДЕНИЕ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО (СЕЛЕКТИВНОГО) ДЕЙСТВИЯ ГЕРБИЦИДОВ ГРУППЫ 2,4-Д

Вводные пояснения. Селективные гербициды — химические вещества, которые в определенных дозах уничтожают сорняки, не повреждая культурные растения. Для борьбы с двудольными сорняками в посевах злаковых применяют производные феноксиуксусной кислоты, в частности дихлорфеноксиуксусную кислоту. Натриевая соль 2,4-Д довольно хорошо растворяется в воде.

В концентрациях 0,01...1 % 2,4-Д подавляет рост и развитие сорных двудольных растений и не повреждает растения семейства Мятликовые (Злаковые). Однако необходимо строго соблюдать концентрацию и расход раствора на единицу площади, так как в очень низких концентрациях гербицид может стимулировать ростовые процессы, а в более высоких концентрациях (выше 1 %) — угнетать рост и развитие всех растений.

Порядок работы. Семи-десятидневные проростки овса и двудольных растений, выращенные вместе в цветочном горшке, опрыскивают из ручного пульверизатора 0,2 %-м раствором натриевой соли 2,4-Д из расчета 20 мл на сосуд. Такие же растения (контрольные), выращенные в другом горшке, опрыскивают водопроводной водой в том же количестве. Записывают состояние растений перед опрыскиванием (в начале опыта) и через неделю после опрыскивания (в конце опыта). Делают вывод о действии соли 2,4-Д на их развитие.

Результаты опыта учитывают по форме (табл. 64).

Материалы и оборудование. Семи-десятидневные проростки овса, гороха и горчицы (смесь), 0,2 %-й раствор натриевой соли 2,4-Д.

Горшки (цветочные), кварцевый песок, ручные пульверизаторы.

64. Действие раствора натриевой соли 2,4-Д на развитие растений

Вариант	Культура	Количество растений		Высота растений (средняя), см		Число листьев (среднее на одно растение)		Фаза развития	
		до опыта	после опыта	до опыта	после опыта	до опыта	после опыта	до опыта	после опыта

Контроль Овес
Горох
Горчица

Раствор Овес
гербицида Горох
Горчица

Работа 77. НАБЛЮДЕНИЕ ЗА НАРУШЕНИЕМ ГЕОТРОПИЗМА КОРНЕЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭОЗИНА

Вводные пояснения. Тропизмы — ростовые движения (изгибы) органов растений, происходящие в результате действия односторонних физических, химических и других раздражителей. Тропизмы строго ориентированы по отношению к направлению действия раздражителя.

Различают следующие виды тропизмов: фототропизм, вызываемый односторонним освещением; геотропизм, или гравитропизм, проявляющийся под действием силы земного притяжения; в соответствии с другими раздражителями — гидротропизм, термотропизм, аэротропизм, хемотропизм, травматропизм.

Проявление тропизмов зависит не только от раздражителей, но и от растения (природы и физиологического состояния органов, концентрации фитогормонов в них). Нарушение жизнедеятельности растения приводит к ослаблению его реакции на раздражения.

Порядок работы. Проросшие семена гороха или фасоли помещают в бюкс и заливают 10 мл 0,05 %-го раствора эозина. Столько же проросших семян одновременно заливают в другом бюксе 10 мл водопроводной воды. Через 1 ч семена вынимают, корешки просушивают фильтровальной бумагой, прикрепляют к подставке так, чтобы они были в горизонтальном положении, и помещают во влажную камеру с темпера-

турой около 20°C на 1 сут. Затем отмечают, у корешков каких проростков появился геотропический изгиб.

Материалы и оборудование. Проросшие семена гороха или фасоли с прямыми корешками, 0,05 %-й раствор эозина.

Подставки для прикрепления семян, влажная камера, боксы, фильтровальная бумага, ножницы.

Работа 78. НАБЛЮДЕНИЕ ЭПИНАСТИЧЕСКИХ И ГИПОНАСТИЧЕСКИХ ИЗГИБОВ ЛИСТЬЕВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГЕТЕРОАУКСИНА

Вводные пояснения. Настии — ростовые движения, которые вызываются диффузно действующими раздражителями (перемена температуры, освещения, изменения влажности и т. п.). Если более быстрый рост наблюдается на морфологически верхней стороне органа, получается изгиб вниз (эпинастия). Более быстрый рост нижней стороны приводит к изгибу вверх (гипонастия).

Порядок работы. Берут два растения томата в возрасте около одного месяца. Наносят ланолиновую пасту с гетероауксином (20 мг гетероауксина на 1 г ланолина) у одних листьев (четыре листа) на нижнюю сторону черешка, у других — на верхнюю. Предварительно измеряют углы отхождения листа от стебля. Через 30...40 мин после нанесения пасты измерение углов повторяют. Отмечают, на сколько градусов изменился угол отхождения листа. Опускание листьев, черешок которых был смазан с верхней стороны, и поднимание

65. Схема записи результатов наблюдений

Номер листа	Место нанесения пасты	Угол отхождения листа от стебля		Изменение угла отхождения листа от стебля, в градусах
		до опыта	после опыта	

- | | |
|---|--------------------|
| 1 | На верхнюю сторону |
| 2 | черешка |
| 3 | |
| 4 | |
| 5 | На нижнюю сторону |
| 6 | черешка |
| 7 | |
| 8 | |

листьев, черешок которых был смазан с нижней стороны, доказывают, что гетероауксин способен давать местное усиление роста черешка.

Результаты опыта записывают по форме (табл. 65).

Материалы и оборудование. Растения томата в возрасте около одного месяца, ланолиновая паста с гетероауксином.

Стеклянные палочки, транспорт.

**Работа 79. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА РОСТ
МЕЖДОУЗЛИЙ СТЕБЛЯ КАРЛИКОВОГО ГОРОХА
ГИББЕРЕЛЛОВОЙ КИСЛОТЫ**

Вводные пояснения. Гибберелловая кислота (ГК) — естественный регулятор роста из группы гиббереллинов. Для обнаружения и испытания веществ этой группы используют их способность стимулировать рост растений. Наиболее распространенный объект таких испытаний — молодые растения карликового гороха. Реакция междоузлий разных ярусов стебля на ГК может иметь количественные различия. Поэтому лучше учитывать влияние обработки растений ГК по стимуляции роста не только всего стебля, но и отдельных его междоузлий.

Порядок работы. Берут два сосуда с двух-трехнедельными растениями гороха. У всех растений измеряют длину междоузлий каждого яруса и суммарно всего стебля. Полученные данные записывают в таблицу 66.

66. Форма записи результатов опыта

Номер междоузлия	Контрольные растения			Обработанные ГК			
	длина, мм		прирост, мм	длина, мм		прирост	
	исходная	конечная		исходная	конечная	мм	% контроля

1
2
3 и т. д.
Стебель

Растения одного сосуда опрыскивают водой, другого — 0,01 %-м раствором ГК, в среднем 1 мл на одно растение. Оба сосуда помещают в теплицу, где предварительно выращивали горох. Через семь дней (на следующем занятии) повторно измеряют длину всех меж-

доузлий стебля, включая и вновь образовавшиеся. Данные вписывают в ту же таблицу. На основании первого и второго измерений высчитывают приросты междоузлий и всего стебля у контрольных и обработанных ГК растений.

Приросты опытных растений выражают в процентах контроля. Для расчета используют средние величины длин каждого яруса у всех растений одного сосуда. На основе анализа полученных данных делают заключение о том, какое из междоузлий стебля карликового гороха сильнее растет в длину под влиянием обработки раствором ГК.

Материалы и оборудование. Литровые сосуды с растениями карликового гороха (песчаная или водная культура), выращенными при длинном дне и естественном или искусственном освещении до двух-трехнедельного возраста (для каждого студента — два сосуда), 0,01 %-й раствор ГК.

Пульверизаторы для воды и раствора ГК отдельно, линейки.

Работа 80. ВЫЯВЛЕНИЕ АПИКАЛЬНОГО ДОМИНИРОВАНИЯ У ГОРОХА

Вводные пояснения. У многих растений верхушка побега подавляет пробуждение спящих почек и рост боковых побегов. Это явление называют апикальным доминированием, оно отражает коррелятивные взаимоотношения между главным и боковыми побегами растения. Удаление или повреждение верхушки главного побега снимает апикальное доминирование, что вызывает пробуждение спящих почек и рост боковых побегов. Горох принадлежит к тем видам растений, у которых сильно выражено апикальное доминирование. Для обнаружения этого явления удаляют верхушку побега гороха и через несколько дней отмечают появление боковых побегов.

Порядок работы. Берут сосуд с растениями гороха. Одни растения оставляют интактными (контроль), у других срезают верхушку побега. Сосуд с растениями ставят в теплицу. На следующем занятии сравнивают контрольные и опытные растения, для чего подсчитывают число и измеряют длину боковых побегов у каждого растения. Данные записывают по форме (табл. 67).

67. Форма записи результатов опыта

Расте ие	Число боковых побегов	Длина боковых побегов, см	
		каждого	суммарная

Интактное
Декапитированное:
 первое
 второе
В среднем

Материалы и оборудование. Сосуды с растениями гороха (песчаная или водная культуры), на каждого студента один сосуд с тремя-четырьмя растениями.
Бритвы, линейки.

Работа 81. НАБЛЮДЕНИЕ ЯРУСНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ

Вводные пояснения. Морфологические признаки метамерных органов (листьев, междоузлий стебля) закономерно изменяются в зависимости от яруса побега. Это хорошо прослеживается при сравнении размеров и формы листьев или длины междоузлий разных ярусов. От нижних к верхним ярусам побега размеры листьев сначала увеличиваются, а затем, достигнув определенного максимума, начинают уменьшаться. У некоторых видов растений закономерно изменяется и рассеченность листовых пластинок (хлопчатник, томат и др.). При графическом выражении ярусной изменчивости получается одновершинная кривая.

Порядок работы. У растений пшеницы или ячменя, находящихся в фазе колошения (или цветения) и, следовательно, сформировавших листья всех ярусов, определяют площадь листьев в качестве показателя метамерной изменчивости. Для этого у листа каждого яруса измеряют ширину основания пластинки и ее длину. Затем рассчитывают площадь листьев по формуле $S = \frac{2}{3} k \cdot x$, где S — площадь листа, k — ширина основания листа, x — длина пластинки.

На миллиметровой бумаге вычерчивают графики, на которых отражают изменение площади листьев в зависимости от яруса побега. По оси абсцисс откладывают номер яруса, считая снизу, а по оси ординат — площадь листьев.

Материалы и оборудование. Растения пшеницы или ячменя в фазе колошения или цветения.

Линейки, миллиметровая бумага.

Работа 82. УСТАНОВЛЕНИЕ ФОТОПЕРИОДИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ГОРЧИЦЫ БЕЛОЙ

Вводные пояснения. Реакция растений на длину дня, получившая название фотопериодизма, способствует их приспособлению к сезонным изменениям жизненно важных факторов внешней среды (температуры, влажности). У фотопериодически чувствительных растений длина дня влияет на вызревание древесины, переход почек к покою, время листопада у древесных и кустарниковых многолетников, вегетативное размножение и генеративное развитие у однолетних, двулетних и многолетних растений.

У однолетних растений с верхушечным соцветием существует обратная коррелятивная связь между скоростью генеративного развития и числом ярусов листьев до соцветия главного побега. Чем быстрее идет развитие, тем меньше образуется листьев на побеге. Это хорошо проявляется у длиннопдневного растения — горчицы белой.

Порядок работы. Предварительно выращивают в фотопериодических камерах растения горчицы белой при длине дня 14, 16, 18 и 24 ч. Посев выполняют соответственно за 2; 1,5 и 1 месяц до занятия студентов при длине дня 14, 16, 18 и 24 ч. Фиксируют сроки посева и цветения растений каждого фотопериодического вари-

68. Форма записи результатов

Вид наблюдения	Длина дня, ч.			
	14	16	18	24

Дней до цветения

Главный побег:

число листьев

» бутонов

число цветков

» стручков

Боковые побеги:

вегетативные

генеративные

анта, данные сообщают студентам во время занятия. Студенты определяют у растений всех вариантов следующие показатели: число листьев главного побега до соцветия, высоту стебля, число бутонов, цветков, стручков (если они образовались), количество цветущих и вегетативных боковых побегов. На основании полученных данных делают вывод о влиянии длины дня на скорость развития растения, число листьев и генеративных органов. Результаты записывают по форме (табл. 68).

Материалы и оборудование. Фотопериодические камеры, вегетативные сосуды с песчаной культурой горчицы белой.

Работа 83. НАБЛЮДЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФИТОХРОМА НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН САЛАТА

Вводные пояснения. Фитохром — пигмент, регулирующий многие процессы роста и развития растений, в том числе прорастание световсхожих семян. Фитохром может находиться в двух формах: поглощающей красный свет и поглощающей дальний красный свет. Под влиянием красного света первая форма превращается во вторую; под влиянием дальнего красного света вторая форма превращается в первую. Физиологический эффект двух форм неодинаковый, часто — противоположный.

Прорастание семян салата стимулируется красным светом и подавляется дальним красным светом. Участие фитохрома в этом процессе подтверждается тем, что стимулирующий эффект красного света на прорастание семян не проявляется, если после красного света семена облучают дальним красным светом.

Порядок работы. Семена салата помещают для прорастания в темный бокс за 8...20 ч до начала занятия; за это время они набухают, но не прорастают из-за отсутствия света. Во время занятия контрольные семена не вынимают из темного бокса, а опытные облучают по схеме: красным светом — 2 мин; дальним красным светом — 4 мин; красным — 2 мин + дальним красным светом — 4 мин. После облучения все семена возвращают в темный бокс. Через несколько дней подсчитывают число проросших семян в контрольном и опытных вариантах. Результаты записывают по форме (табл. 69).

69. Влияние фитохрома на прорастание семян

Вариант	Всего семян	Проросших семян		Разница с контролем
		число	% общего их числа	

Контроль (темнота)
Красный свет
Дальний красный свет
Красный+дальний красный свет

Материалы и оборудование. Облучатели красного цвета (люминесцентные лампы с двумя слоями красного целлофана) и дальнего красного света (лампы накаливания с двумя слоями красного и двумя слоями синего целлофана, водным экраном), чашки Петри с семенами салата.

Темные боксы, пинцеты.

Работа 84. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИЛЫ РОСТА СЕМЯН МЕТОДОМ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ПРОРОСТКОВ

Вводные пояснения. Наиболее полно истинные посевные качества семян характеризуются силой роста, т. е. способностью проростков к быстрому, дружному прорастанию и интенсивному росту. На силу роста большое влияние оказывают крупность семян, условия их формирования и хранения. Для посева используют семена, сила роста которых не менее 80 %.

Цель работы — изучить зависимость силы роста от массы зерна, метеорологических условий года получения урожая, длительности хранения семян, а также исследовать влияние кумарина как одного из аллелопатических агентов на прорастание семян зерновых культур. Силу роста определяют проращиванием семян в рулонах и выражают в процентах сильных проростков к общему числу семян в пробе.

Порядок работы. Для каждого варианта берут отдельную полоску полиэтиленовой пленки размером 60×15 см, накрывают ее такой же полоской фильтровальной бумаги, которую используют в качестве ложа для семян. Во всю длину проводят линию карандашом на расстоянии 5 см от верхнего края. На эту линию укладывают 50 семян зародышем вниз на расстоянии 1 см одно от другого. Накрывают семена по всей длине ложа увлажненной полоской фильтровальной бума-

ги шириной 5 см, свертывают в рулон, связывают шпагатом, снабжают этикеткой и ставят вертикально в сосуд, на дно которого налита вода. При изучении влияния кумарина на силу роста семян контрольные семена ставят на проращивание в воду, опытные — в раствор кумарина концентрацией 50 мг/л.

Проращивают семена в темноте в течение пяти дней при температуре 20°C. Затем разворачивают рулон, оценивают проростки по пятибалльной шкале, определяют сырую массу надземной части и корней для всех 50 проростков вместе. Качество проростков оценивают по следующей шкале:

<i>Сильные проростки</i>		<i>Балл</i>
Длина ростка превышает 5 см, лист вышел из coleoptily или равен его длине, число зародышевых корешков — пять и более		5
Длина ростка не менее 4 см, лист в coleoptily, превышает $\frac{3}{4}$ его длины, число зародышевых корешков — не менее четырех		4
Длина ростка не менее 2,5 см, лист в coleoptily более $\frac{1}{2}$ его длины, число зародышевых корешков — не менее трех		3
<i>Слабые проростки</i>		
Длина ростка менее 2,5 см, лист менее $\frac{1}{2}$ длины coleoptily, число зародышевых корешков — два и более		2
Росток по длине менее двух длин зерновки, число зародышевых корешков — два и более		1
Количество ненормально проросших семян		
Количество непроросших (набухших, загнивших, твердых)		

Результаты наблюдений записывают по форме (табл. 70). Делают выводы о влиянии условий выращивания, длительности хранения семян и действии химических регуляторов на силу роста.

70. Морфофизиологическая оценка проростков

Вариант	Оценка в баллах					Сумма баллов	Сила роста, %	Сырая масса, г		Отношение массы надземной части к массе корней
	5	4	3	2	1			надземной части	корней	

Материалы и оборудование. Технические весы, кристаллизаторы, полоски полиэтиленовой пленки и фильтровальной бумаги, шпагат, семена пшеницы и ржи разных лет уборки урожая (крупная и мелкая фракции семян), кумарин, метеорологические данные трех последних лет.

УСТОЙЧИВОСТЬ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ УСЛОВИЯМ

Устойчивость растений к неблагоприятным условиям среды с точки зрения агрономической науки оценивается по тому, насколько изменяется продуктивность растений под влиянием этих условий по сравнению с продуктивностью их на оптимальном фоне. Оценка устойчивости растений к экстремальным факторам (холоду, морозу, засухе, жаре, засоленности) важна для селекционной и агрономической практики.

Наиболее надежные методы оценки устойчивости растений к экстремальным факторам — прямые полевые и вегетационные методы. Однако большая трудоемкость и продолжительность этих методов вынуждает исследователей применять разнообразные ускоренные лабораторные или лабораторно-полевые методы диагностики устойчивости растений.

В предлагаемом разделе практикума представлены работы, демонстрирующие физиологические и биохимические свойства, определяющие устойчивость растений, показаны наиболее часто применяемые методы диагностики. Для подготовки растений, контрастных по устойчивости, ставят агротехнические опыты с удобрениями, сроками сева, сортами и др. Растения выращивают также на полевых микроделянках и в условиях вегетационных опытов.

Зимостойкость и холодостойкость. На территории нашей страны наиболее губительны для растений низкие температуры воздуха и почвы. Низкие отрицательные температуры повреждают зимующие растения, низкие положительные температуры оказывают неблагоприятное воздействие на ход физиологических процессов и формирование урожая теплолюбивых растений.

В естественных условиях устойчивость зимующих растений складывается из морозостойкости, устойчивости к выпреванию, вымоканию, действию ледяной корки и зимней засухи (у древесных растений и к солнечным ожогам).

Используют несколько способов диагностики состояния зимующих растений. Для озимых — это метод отращивания монолитов; ускоренный, водный метод,

предложенный Донским научно-исследовательским институтом сельского хозяйства; определение повреждения по окрашиванию тканей красителями; по состоянию конуса нарастания.

Успех селекционной работы, выбор агротехнических приемов, повышающих холодо- и морозостойкость, в значительной мере определяются правильностью выполнения анализов. Наиболее объективны прямые полевые исследования. К косвенным методам определения морозоустойчивости относят: определение динамики углеводов, активности β -фруктофуранозидазы, степени склерификации узла кущения, выхода электролитов, изменения электрической проводимости тканей, биопотенциалов, хемилюминесценции, поляризации, состояния конуса нарастания и др. Большинство перечисленных методов применимо и к диагностике холодостойкости растений.

Устойчивость к вымоканию и выпреванию определяют обычно при прямых и лабораторных анализах.

Засухоустойчивость. Проблема засухоустойчивости растений актуальна для многих регионов нашей страны с аридным климатом. Засухоустойчивы те растения, которые способны в процессе онтогенеза приспосабливаться к действию засухи и осуществлять в этих условиях рост, развитие и воспроизведение.

Физиологическая засухоустойчивость складывается из способностей растений переносить обезвоживание и действие высоких температур. Поэтому при изучении засухоустойчивости необходимо исследовать как способность выносить обезвоживание, так и перегрев. Для диагностики засухоустойчивости предпочтительнее использовать прямые методы, непосредственно связанные с засухоустойчивостью. К ним относят: определение засухоустойчивости в засушниках; эксикаторный метод определения способности растений выносить обезвоживание; определение водоудерживающей способности; метод коагуляции белков; определение гидрофильности коллоидов цитоплазмы, содержания свободной и связанной воды, эластичности и вязкости протоплазмы; метод крахмальной пробы и др.

Для массового анализа применяют косвенные методы: определения водного потенциала растений; засухоустойчивости по ростовым реакциям, по выходу электролитов, по содержанию статолитного крахмала, по

устойчивости пигментного комплекса, по движению цитоплазмы, по электрическому сопротивлению тканей и др.

Солеустойчивость. Значительное распространение засоленных почв на территории нашей страны и существенное снижение продуктивности сельскохозяйственных культур в этих условиях вызывает необходимость оценки степени солеустойчивости растений. Последнее имеет важное значение для селекции, интродукции и технологии возделывания.

Критерием солеустойчивости растений служит степень снижения продуктивности при засолении по сравнению с продуктивностью на нормальном фоне. Определяют солеустойчивость прямыми, а также менее трудоемкими косвенными методами. На засоленных почвах обычно снижается всхожесть семян, поэтому оценку солеустойчивости выполняют по показателям прорастания семян (энергия прорастания, процент всхожести, скорость прорастания). Из косвенных лабораторных методов наиболее известны: плазмолитический; определения скорости раскрытия устьиц в растворах солей; степени и скорости «выцветания» хлорофилла, количества альбуминов, проницаемости протоплазмы; биохемилюминесценция и др.

Работа 85. ВЫЯВЛЕНИЕ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ САХАРОВ НА ПРОТОПЛАЗМУ

Вводные пояснения. При воздействии отрицательных температур на растительные ткани в межклетниках образуется лед, который, оттягивая воду из клеток, обезживает протоплазму. При определенной степени обезживания, индивидуальной для каждого растительного организма, протоплазма коагулирует.

Кристаллы льда, образующиеся непосредственно в клетках, оказывают механическое воздействие, в результате чего нарушается внутренняя структура протоплазмы, резко повышается ее проницаемость, а при длительной экспозиции на морозе наступает отмирание. Скорость отмирания протоплазмы клеток зависит как от температуры и времени экспозиции, так и от вододерживающей способности самой клетки. Увеличение количества растворимых сахаров в зимующих органах

растений повышает водоудерживающую способность тканей.

Порядок работы. Из поперечного среза красной столовой свеклы толщиной 0,5 см при помощи пробочного сверла диаметром 5...6 мм делают высечки. Тщательно ополаскивают их водой и помещают в три пробирки по три-четыре высечки в каждую. В первую пробирку наливают 5 мл дистиллированной воды, во вторую — 0,5 мл 0,5 М раствора сахарозы, в третью — 5 мл 1 М раствора сахарозы. Пробирки этикетировуют и на 20 мин погружают в охлаждающую смесь, состоящую из трех частей льда или снега и одной части поваренной соли. Затем пробирки вынимают из охлаждающей смеси и размораживают в стакане воды комнатной температуры.

Отмечают различия в интенсивности окрашивания жидкостей в пробирках и объясняют их. Из анализируемых высечек готовят тонкие срезы и рассматривают их под микроскопом при малом увеличении в капле того же раствора, в котором они находились. Подсчитывают общее число клеток в одном поле зрения и число обесцвеченных клеток, из которых вышел антоциан. Результаты опыта записывают по форме (табл. 71).

71. Определение защитного действия сахаров на протоплазму

Условия	Число клеток в поле зрения микроскопа		Отношение числа окрашенных клеток к общему их числу, %	Вывод
	всего	окрашенных		

Вода
Сахароза:
0,5 М
0,1 М

Материалы и оборудование. Корнеплоды свеклы, 0,5 и 1 М растворы сахарозы, поваренная соль, лед колотый или снег.

Термометры до 30 °С, скальпели, пробочные сверла диаметром 6 мм, бритвы, пробирки, микроскопы, предметные стекла, кисточки, карандаши по стеклу, фильтровальная бумага, лопатки для охлаждающей смеси.

**Работа 86. ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ САХАРА
НА БЕЛКИ ПРОТОПЛАЗМЫ
ПРИ ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ**

Вводные пояснения. При действии на растение экстремальных температур белки коагулируют. Выпадение хлопьевидного осадка белка из вытяжки растительной ткани — показатель ее повреждения. Сахароза стабилизирует нативную структуру белка, тем самым защищая ее от губительного действия отрицательных температур.

Порядок работы. Очищенный клубень картофеля натирают на терке, переносят на двойной слой марли, отжимают через нее сок в коническую колбу и дают отстояться крахмалу. Надосадочную жидкость наливают в три пробирки по 2,5 мл в каждую. В первую пробирку добавляют 2,5 мл дистиллированной воды, во вторую — 2,5 мл 0,5 М раствора сахарозы, в третью — 2,5 мл 1 М раствора сахарозы. Перемешивают содержимое в пробирках и ставят в охлаждающую смесь на 20 мин (см. работу 85). Отстаивают пробирки в стакане с водопроводной водой и, не встряхивая, наблюдают образование хлопьев коагулировавшего белка. Пробирки зарисовывают, делают выводы о защитном действии сахарозы при заморзании растительных тканей.

Материалы и оборудование. Клубни картофеля, 0,5 М и 1 М растворы сахарозы, снег и поваренная соль.

Терки, марля, конические колбы, пробирки, пипетки на 10 мл, чашки для охлаждающей смеси, термометры до 30 °С.

**Работа 87. СПОСОБ ЗАКАЛИВАНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ
МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ ОЗИМЫХ ЗЛАКОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКЗОГЕННЫХ САХАРОВ**

Вводные пояснения. Для сравнительного определения потенциальной морозоустойчивости сортов зерновых культур можно использовать лабораторные способы закаливания и определения морозоустойчивости. Для прохождения первой фазы закаливания растениям необходимо хорошо освещенное помещение, температура в котором поддерживается около 0 °С. В условиях достаточного освещения в результате фотосинтеза в клетках накапливаются сахара. Для упрощения методики в Институте физиологии растений АН СССР разработан метод закаливания в темноте. В этом случае накопле-

ние сахаров идет за счет поглощения их из растворов при низкой положительной температуре.

Порядок работы. Растения трех-четырех сортов, различающихся по морозоустойчивости, выращивают до фазы кущения в оптимальных условиях. Затем их выкапывают, отмывают от почвы и в пучках по 20...25 растений помещают в стаканчики объемом 50 мл, которые на $\frac{1}{3}$ заполнены раствором сахарозы (должны быть погружены корни и узлы кущения).

Для закаливания растения последовательно помещают в 5, 10, 15%-е растворы сахарозы, выдерживая в каждом из них по четыре-пять дней. При этом поддерживают температуру, максимально близкую к 0 °С. Затем растения вынимают из раствора, ополаскивают водой, заворачивают в бумагу и промораживают при нескольких температурах по следующей схеме: три дня при минус 5 °С, один день при минус 16 °С, один день при минус 25 °С. Затем растения вынимают из холодильника и, не разворачивая бумагу (чтобы избежать быстрого оттаивания), переносят в холодное помещение с температурой около 2 °С. Оттаявшие растения отрачивают. Живые растения учитывают через одну-две недели после высадки. Результаты опытов записывают по форме (табл. 72).

72. Определение морозоустойчивости растений

Вариант	Количество отросших растений (%) после промораживания при температуре, °С				Выводы о морозоустойчивости растений
	0	5	16	25	

1
2
3

Материалы и оборудование. Семена растений сортов с различной морозоустойчивостью.

Ящики для посадки растений, стеклянные стаканчики на 50 мл, 5, 10, 15, 20%-е растворы сахарозы, бумага, холодильник, ящики для отраживания растений.

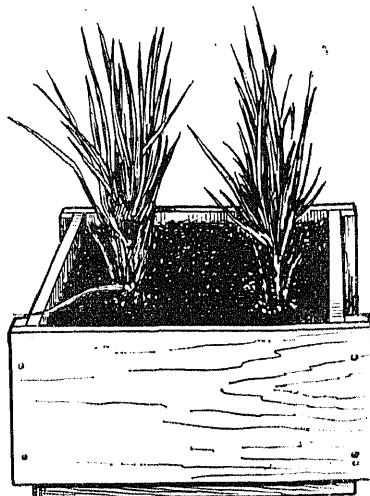
Работа 88. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ОЗИМЫХ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР В ЗИМНИЙ ПЕРИОД МЕТОДОМ МОНОЛИТОВ

Вводные пояснения. В период зимовки озимых культур, особенно в годы с неблагоприятными погодными усло-

Рис. 26. Монолит, отобранный в стандартный ящик

виями, необходимо систематически наблюдать за состоянием посевов. Наиболее надежный метод анализа их состояния — отращивание растений в монолитах.

Порядок работы. Монолиты для отращивания вырубают топором или ломом. Для отбора монолитов используют ящики размером $30 \times 30 \times 15$ см. Работу выполняют при температуре воздуха не ниже минус $12 \dots$ минус 14°C . Транспортируя монолиты в помещение, их утепляют соломой или мешковиной. Размораживают монолиты в помещении с температурой не выше $5 \dots 10^\circ\text{C}$ до полного оттаивания. Создание таких условий обеспечивают, накрывая растения полиэтиленовой пленкой. У оттаявших растений обрезают надземную массу на высоте $5 \dots 6$ см от поверхности почвы. Для отращивания монолиты помещают в хорошо освещенное помещение с температурой воздуха $15 \dots 20^\circ\text{C}$, поливают водой комнатной температуры, не допуская переувлажнения почвы. Общий вид монолита, отобранного в стандартный ящик, приведен на рисунке 26.



73. Определение жизнеспособности растений

Вариант	Учет	Количество выживших растений при отборе монолита, % общего их числа			Выводы о жизнеспособности растений
		25 января	29 февраля	10 марта	

I	1
	2
II	1
	2
III	1
	2

Первый учет жизнеспособности растений выполняют через десять дней, повторно — каждые 15..20 дней. К живым относят растения, образовавшие листья и новые узловые корни. При общей оценке жизнеспособности учитывают такие показатели, как количество живых растений, интенсивность отрастания листьев. Результаты опыта записывают по форме (табл. 73).

Материалы и оборудование. Ящики для монолитов, ломы или топоры, полиэтиленовая пленка, ножницы.

**Работа 89. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТОЯНИЯ
ОЗИМЫХ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР
ПО ОТРАСТАНИЮ В ВОДЕ**

Вводные пояснения. Для определения состояния озимых используют и водный метод. В двух-четырех типичных местах посева выбирают растения из двух смежных рядов длиной по 0,5 м каждый, подрубая их на глубине 8..10 см. Осторожно, чтобы не повредить узлы кушения, отделяют их от почвы. Извлеченные растения вместе с комьями земли укладывают в ящик (каждый ряд отдельно) и сверху накрывают мешковиной или брезентом. Оттаивают собранный материал в тех же условиях, что и монолиты. После оттаивания растения каждой пробы отделяют от почвы и промывают водой комнатной температуры. Затем у них обрезают корни на 3..4 см и стебли с листьями на 5..6 см от узлов кушения.

Подготовленные растения помещают в растильни, наполовину заполненные водой (корни и нижняя часть узлов кушения должны находиться в воде). Воду в растильнях меняют каждые два дня. Растения отращивают в освещенном помещении с температурой воздуха 15..20 °С. На седьмой день учитывают живые растения. Погибшие растения не образуют новых листьев и узловых корней. Общий вид растений на седьмой день отращивания приведен на рисунке 27.

Результаты опыта записывают по форме (см. предыдущую работу).

Для более быстрого определения состояния посевов применяют отращивание растений в растворе сахара. В этом случае в растильни, приготовленные для отращивания, наливают 2%-й раствор сахарозы и выдерживают в нем растения 13..15 ч. Затем раствор заменяют

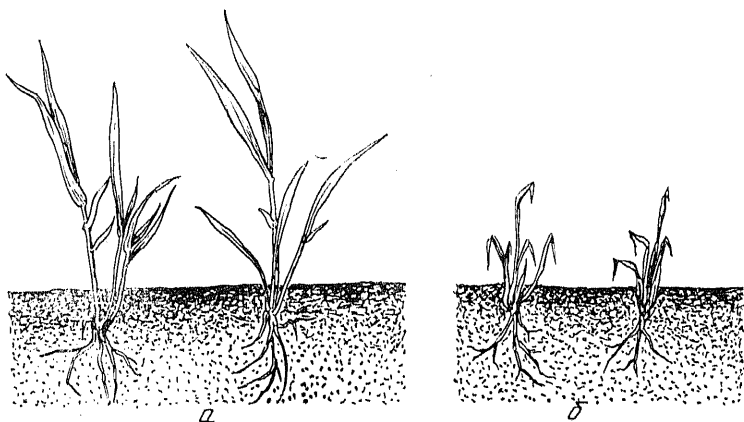


Рис. 27. Растения на седьмой день отращивания водным методом: *а* — здоровые, *б* — погибшие

обыкновенной водой и продолжают отращивание. Предварительное определение жизнеспособности растений осуществляют через один-два дня после начала отрастания у них корней.

Материалы и оборудование. Раствор сахарозы (2 %).

Ящики для монолитов, тоноры, полиэтиленовая пленка, ножницы, растительный.

Работа 90. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ОЗИМЫХ КУЛЬТУР УСКОРЕННЫМ МЕТОДОМ

Вводные пояснения. Состояние озимых культур в весенне-зимний период можно определить путем наблюдения приростов меристемной ткани у обрезанных узлов кущения.

Порядок работы. Пробы для анализа из 30...50 растений отбирают по диагонали участка. После оттаивания растения отмывают от почвы и обрезают листья и стебли на расстоянии 1...1,5 см от узла кущения. Корневую систему удаляют полностью (рис. 28). Готовый материал помещают в чашки Петри, на дно которых кладут хорошо смоченный водой слой ваты или марли. Чашки Петри закрывают крышками. Пробы выдерживают 12...16 ч при 24...26 °С.



Рис. 28. Отрастание стеблей разных сортов пшеницы из об-
резанных узлов кушения через 24 ч: верхний ряд — Миро-
новская-808; средний — Безостая-1; нижний ряд — Одесская
Юбилейная

Анализ проб выполняют по отросшей части узлов кушения, прирост которых к этому времени составляет 3...15 мм. Растения, узлы кушения которых дают интенсивный прирост (около 10 мм и более), считают хорошо сохранившимися. В дальнейшем, при нормальных условиях, такие растения могут обеспечить урожай. Слабый прирост (3...5 мм) указывает на то, что растения сильно повреждены и продуктивность их будет низкой. Результаты записывают по следующей форме:

Вариант	Прирост, мм	Отношение числа отросших растений к общему их числу, %	Выводы о состоя- нии посевов

Материалы и оборудование. Ножницы, чашки Петри, марля или вата, полиэтиленовая пленка, фильтровальная бумага.

**Работа 91. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ
ОЗИМЫХ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР
ПО КОНУСУ НАРАСТАНИЯ**

Вводные пояснения. Метод биологического контроля посевов позволяет определить способность озимых растений формировать продуктивные колосья.

Порядок работы. В двух — четырех типичных местах посева выбирают растения вместе с почвой из двух смежных рядов длиной по 0,5 м. Для учебных целей достаточно отобрать по 5...10 растений каждого варианта. Осторожно, чтобы не повредить узлы кушения, растения укладывают в ящик и утепляют. Оттаивают материал при 5...10°C в течение 10...12 ч. Затем растения отделяют от почвы и промывают водой комнатной температуры. Обрезают корни на расстоянии 2 см, а стебли с листьями на 5...6 см от узла кушения. Растения помещают вертикально в растильни, наполовину заполненные водой.

Через главный и боковые побеги делают продольные разрезы лезвием, но не по центру, а несколько сбоку, чтобы не разрезать конус нарастания. Иглой осто-

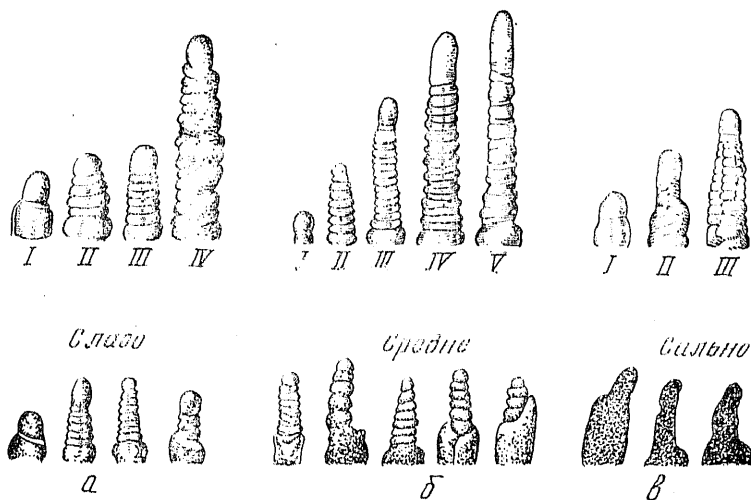


Рис. 29. Конусы нарастания здоровых (вверху) и поврежденных (внизу) растений озимых культур на разных этапах органогенеза (I—V):

а — пшеницы; б — ржи; в — ячменя

рожно удаляют недоразвитые листья, покрывающие конус нарастания, и рассматривают в бинокулярную лупу. Для более точного анализа исследуют конусы нарастания и боковых побегов. Состояние конусов нарастания оценивают по трехбалльной шкале: I группа растений — конус прозрачный, живой, тургорный, слегка опалесцирующий — 3 балла; II группа — конус живой белый, тургорный, мутный, неопалесцирующий — 2 балла; III группа — конус мертвый бурый, сморщенный, мацерированный — 1 балл (рис. 29). Состояние растений оценивают с учетом количества побегов с различной степенью повреждения конуса нарастания в процентах общего их числа у анализируемых растений. Средний балл рассчитывают по формуле

$$СБ = \frac{\text{Балл по группе} \times \text{Число растений в группе}}{\text{Общее число растений варианта}}.$$

Результаты опыта записывают по форме (табл. 74).

74. Определение состояния посевов

Вариант	Число растений	Число растений, имеющих конусы нарастания главного побега			Вывод о состоянии посевов
		группы по баллам			
		I	II	III	

Материалы и оборудование. Растильни, скальпели, холодильник, препаровальные иглы, бинокулярные лупы.

Работа 92. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ОЗИМЫХ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР ОКРАШИВАНИЕМ ТКАНЕЙ

Вводные пояснения. Наблюдение за конусом нарастания можно выполнять при помощи окрашивания тканей красителями, например кислым фуксином, тетразолом.

Порядок работы. Окрашивание тканей кислым фуксином. Чтобы определить состояние клеток стеблевого конуса нарастания, через нижнюю полусантиметровую часть побега по центру его делают продольный срез. В последующем просматривают лишь одну половину, которую предварительно погружают в 0,3%-й раствор фуксина на 15 мин. Затем при помощи

пипетки или капельницы раствор красителя смывают до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Затем срезы накрывают покровными стеклами и рассматривают под микроскопом при увеличении $\times 70 \dots \times 100$.

Состояние побега оценивают по тому месту среза, где находятся конус нарастания, окружающие его листочки и нижняя стеблевая часть. Живые клетки тканей после окрашивания и промывания водой остаются бледно-зелеными или бесцветными, поврежденные окрашиваются в слабо-розовый цвет, погибшие становятся ярко-красными. При просмотре срезов обращают внимание на следующее:

не окрашена ли в розовый цвет тонкая прослойка клеток стеблевой части побега под конусом нарастания (при этом повреждении отмирание побега может проявиться очень поздно — перед колошением — образовавшиеся колосья могут быть бесплодными);

не окрашены ли в красный или розовый цвет клетки стеблевой части побега и клетки конуса роста, что свидетельствует о больших повреждениях посевов.

Если наиболее развитый побег у растения оказался жизнеспособным, другие побеги не анализируют. Если же главный побег нежизнеспособен, анализируют второй, а в случае его повреждения — последующие побеги. Степень повреждения растений выражают в процентах общего числа побегов в пробе. Результаты опытов записывают по форме (табл. 75).

75. Определение жизнеспособности растений

Вариант	Побег	Состояние конусов нарастания побегов		Количество живых растений, % общего их числа	Оценка состояния посевов
		число живых	число поврежденных		

I	1
II	2
	3

Окрашивание тканей тетразолом. В обычном состоянии тетразол (трифенилтетразолхлорид) — бесцветное вещество. Однако в живых клетках под действием ферментов он превращается в ярко окрашенный продукт — формазин, который накапливается в виде кристаллов малинового или темно-вишневого

цвета. Особенно ярко окрашиваются активные меристемные ткани. Мертвые нежизнеспособные клетки окраски не приобретают.

Для анализа растений берут пробы и готовят, как и при окрашивании кислым фуксином. Половинки стебля длиной 5 мм с обнаженным конусом нарастания заливают 0,5%-м раствором тетразола и помещают на 1 ч в термостат при 40°C. После этого подсчитывают число живых и погибших растений. У живых растений конус нарастания окрашивается в оранжевый или красный цвет, у погибших — не окрашивается. Окраска тетразолом при различной степени повреждения приведена на рисунке 30. Результаты опытов записывают по форме, приведенной для окрашивания тканей кислым фуксином.

Материалы и оборудование. Кислый раствор фуксина, 0,5%-й раствор тетразола.

Лезвия бритвы, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, чашки Петри, термостат, микроскопы, капельницы или пипетки.

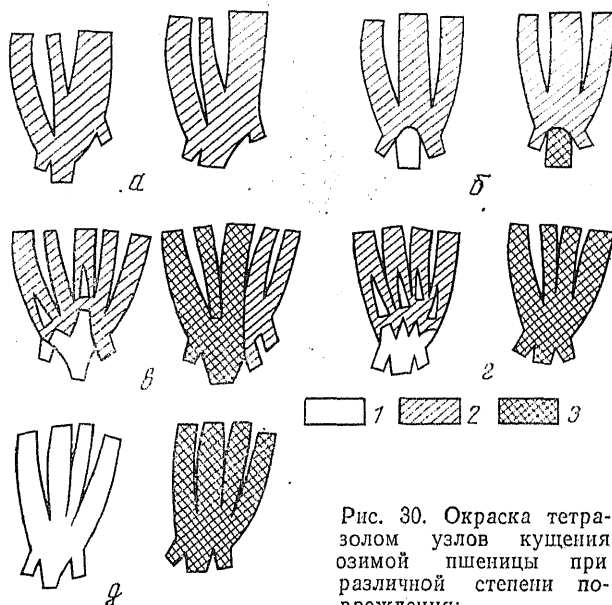


Рис. 30. Окраска тетразолом узлов кущения озимой пшеницы при различной степени повреждения:

a — повреждений нет; *б* — слабое повреждение; *в* — среднее; *г* — сильное повреждение; *д* — полная гибель растений (*справа* — окраска после промораживания; *слева* — то же после промораживания и последующего отращивания); 1 — окраска отсутствует; 2 — малиново-красная окраска тканей; 3 — побурение отмерших тканей

**Работа 93. ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ РАСТЕНИЙ
ПОСЛЕ ПЕРЕЗИМОВКИ
ПО СОСТОЯНИЮ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ**

Вводные пояснения. Нередко вышедшие из-под снега растения без видимого подмерзания листьев можно принять за благополучно перезимовавшие. Однако спустя некоторое время после возобновления вегетации наблюдается массовое отмирание таких растений вследствие повреждения корневой системы.

Порядок работы. В двух — четырех типичных местах посева выбирают 25...30 растений и подрубают их на глубине 10...12 см. Доставленный с поля материал после оттаивания отделяют от почвы, промывают водопроводной водой, обсушивают фильтровальной бумагой. Затем у растений отрезают корни вместе с нижней частью узла кущения, помещают их в пробирки — по пять корней в каждую и заливают реакционным раствором.

Реакционный раствор готовят, смешивая одну часть (по объему) 5%-го раствора трифенилтетразолия, четыре части 0,4 М раствора сукцината (янтарно-кислого) калия и пять частей фосфатной буферной смеси с pH 7. Пробирки с корнями переносят в темный термостат с температурой 40 °C на 3 ч. Затем корни пинцетом вынимают из пробирок, промывают буферным раствором, раскладывают в чашках Петри, на дно которых наливают дистиллированную воду, просматривают при помощи лупы и оценивают окрашивание корней. Молодые жизнеспособные корни равномерно окрашиваются в красный с малиновым оттенком цвет. Отмирающие и поврежденные морозом корни окрашиваются неравномерно. Мертвые корни или погибшие участки корней не окрашиваются.

Анализируют корни каждого растения. Учитывают количество живых корней, % общего количества корней в пробе. Повреждение корней в пределах 10...15 % свидетельствует об относительно благополучной перезимовке растения. Растения, корни которых повреждены более чем на 50 %, впоследствии погибают. Выводы о состоянии посева делают по результатам анализа всех 25...30 растений.

Материалы и оборудование. Монолиты озимых культур, пробирки, трифенилтетразолий, янтарно-кислый калий, фосфатный буфер, термостат, пинцеты, чашки Петри, лупы.

**Работа 94. ДИАГНОСТИКА УСТОЙЧИВОСТИ
ОЗИМЫХ КУЛЬТУР
К ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМУ ВЫПРЕВАНИЮ**

Вводные пояснения. Выпревание наблюдается главным образом на тяжелых почвах с плохой водопроницаемостью. Чаще всего этот процесс происходит под глубоким снегом в темноте при отсутствии фотосинтеза, когда наблюдается слабый рост, постепенное углеводно-белковое истощение и гибель растений. Иногда в районах с небольшим и неустойчивым снежным покровом, при рассеянном свете и высокой влажности развивается снежная плесень, которая также вызывает гибель растений. Для оценки устойчивости растений к выпреванию на ранних этапах онтогенеза можно моделировать выпревание.

Порядок работы. Семена различных сортов озимых зерновых, различающихся по устойчивости к выпреванию, высевают в кюветы в почву или речной песок (50...100 семян на кювету в четырехкратной повторности по каждому варианту). На второй день после появления всходов растения помещают в камеры с условиями, близкими к тем, которые наблюдаются под глубоким снежным покровом: темнота, температура 0...2°C, высокая влажность воздуха (выше 90...93 %) и почвы.

Через 30, 40, 50, 60 дней пребывания в камере растения выносят для отращивания в теплицу или оранжерею. Отращивают при 20...26°C, освещенности 5000...20000 лк, продолжительности освещения 16 ч. На

76. Определение устойчивости растений к выпреванию

Вариант	Выпревание через, дней	Количество выживших растений, % общего числа всходов	Вывод
1	30		
	40		
	50		
	60		
2	30		
	40		
	50		
	60		

десятый день отращивания подсчитывают число нормально отросших растений. Результаты опытов записывают по форме (табл. 76).

Устойчивыми к выпреванию считают растения, нормально отросшие после 50...60 дней пребывания в камере, среднеустойчивыми — после 40...50 дней, слабоустойчивыми — после 30...40 дней.

Материалы и оборудование. Семена озимых зерновых, различающихся по устойчивости к выпреванию, кюветы для проращивания, камеры для выпревания.

Работа 95. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ЗАКАЛИВАНИЯ ОЗИМЫХ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

Вводные пояснения. Важная биологическая особенность озимых зерновых культур — способность к закаливанию, что позволяет растениям переносить неблагоприятные условия зимнего периода. О степени закаленности растения позволяет судить метод, основанный на определении жизнеспособности эпидермиса нижней стороны листа после закаливания. Во время закаливания озимых клетки эпидермиса нижней стороны листа приобретают повышенную прочность к механическим повреждениям. Поэтому при срывании эпидермиса листа закаленного растения клетки его не повреждаются и могут плазмолизировать. У незакаленных растений клетки повреждаются и теряют способность к плазмолизу. Таким образом, количество прочных клеток служит определенным критерием степени закаливания озимых хлебов.

Порядок работы. У закаленных и незакаленных растений с нижней стороны средней части первого листа срывают эпидермис. Удобнее оторванный лист положить на указательный палец левой руки, затем сделать бритвой неглубокий поперечный разрез и осторожно снять эпидермис вдоль листа. Изолированный эпидермис помещают для окрашивания протоплазмы клеток на несколько минут в водный 0,05%-й раствор нейтральро-та. Окрашенные срезы переносят на предметное стекло в каплю 0,75 М раствора сахарозы и накрывают покровным стеклом. Через несколько минут неповрежденные клетки плазмолизуют. По каждому варианту делают два-три среза. Клетки подсчитывают в двух-трех полях зрения микроскопа. Количество плазмолизиро-

77. Определение степени закаливания растений

Вариант	Число плазмолизированных клеток	Общее число клеток в поле зрения	Содержание плазмолизированных клеток, % Вывод
---------	---------------------------------	----------------------------------	--

1
2

ванных клеток выражают в процентах общего числа клеток в поле зрения микроскопа. Содержание плазмолизированных клеток характеризует степень закаливания растений. Результаты опыта записывают по форме (табл. 77).

Материалы и оборудование. Лезвия бритвы, чашки Петри, 0,05%-й раствор нейтрального, 0,75 М раствор сахарозы, предметные и покровные стекла, микроскоп, растения озимых культур.

Работа 96. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ НА ПРОРОСТКАХ

Порядок работы. Каждый образец опытных семян насыпают отдельно в кристаллизатор, заливают водой на 4...5 см выше поверхности семян и ставят в термостат при 15°C для набухания на сутки. Затем воду сливают и семена оставляют при той же температуре для прорастания еще на двое суток.

Перед закаливанием из каждого образца отбирают по 50...100 семян приблизительно одинакового размера (\varnothing 5...8 мм), заворачивают с этикеткой в хорошо отжатый кусочек марли и помещают на вкладыш в эксикатор для закаливания. Эксикатор ставят в холодильную камеру на семь суток при температуре 0...2°C. За это время проростки проходят первую фазу закаливания. Затем обеспечивают условия для прохождения второй фазы закаливания (температура минус 4...минус 5°C в течение трех суток). Промораживание выполняют в течение одних — трех суток при температуре минус 10...минус 15°C. Промороженные растения оттаивают в течение суток при 2°C. Затем на дно эксикатора наливают воду для создания влажной атмосферы и выдерживают в нем семена еще двое суток при 20...25°C. После этого проростки переносят в растильни. Через семь дней отращивания в растильне при 20...25°C учитывают выжившие растения и делают заключение об устойчивости сорта.

Результаты опыта записывают по следующей форме:

Вариант	Количество выживших проростков, % общего числа	Вывод

Материалы и оборудование. Семена растений двух-трех сортов, различающихся по морозоустойчивости.

Кристаллизаторы, термостат, эксикаторы, холодильные камеры, миллиметровая бумага, марля, лотки для отращивания растений.

Работа 97. ОЦЕНКА ХОЛОДОСТОЙКОСТИ КУКУРУЗЫ НА ПЕРВЫХ ЭТАПАХ РОСТА И РАЗВИТИЯ

Вводные пояснения. В период вегетации кукуруза иногда подвергается длительному воздействию низких температур и кратковременных заморозков, оказывающих сильное влияние на ход физиологических процессов, формирование урожая и качество семян. Изучение отзывчивости организма на температурное воздействие имеет большое значение особенно в периоды набухания, прорастания семян и роста проростков. Различия в способности сортов кукурузы адаптироваться к условиям пониженной температуры выражаются в скорости прорастания семян и темпах роста проростков.

Порядок работы. Всхожесть семян определяют в растильнях на фильтровальной бумаге, концы которой опускают в воду. Проращивают 50...100 семян (по каждому варианту) в камерах холодильной установки при 14, 10, 6 °С. На шестой день проращивания определяют процент всхожести. Результаты опыта записывают по следующей схеме:

Вариант	Количество проросших семян при температуре, % общего их числа			Вывод
	14 °С	10 °С	6 °С	

Материалы и оборудование. Растения двух-трех сортов, различающихся по холодоустойчивости.

Холодильные установки, фильтровальная бумага, растильни.

**Работа 98. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ
ПО СТЕПЕНИ ПРОНИЦАЕМОСТИ ПРОТОПЛАЗМЫ
ДЛЯ ЭЛЕКТРОЛИТОВ**

Вводные пояснения. При действии низких температур происходят различные изменения физико-химических свойств клеточных мембран, в частности повышается их проницаемость для электролитов.

Порядок работы. Растения выращивают до фазы двух-трех листьев. Первый этап закаливания осуществляют в течение семи дней при 2 °С, второй — в течение трех дней при минус 4 °С. Промораживанию подвергают отрезки стебля длиной 1...1,5 см при минус 7, минус 9, минус 15 °С в течение 6 ч. После промораживания берут три навески по 0,5 г (по каждому варианту), помещают в ячейки для определения электрической проводимости и наливают одновременно в каждую ячейку по 50 мл дистиллированной воды. Продолжительность экстракции 4 ч при комнатной температуре.

В качестве контроля используют значение электрической проводимости раствора, полученного при экзоосмосе (выходе электролитов) из убитых при кипячении тканей стебля. Для этого одну навеску растений (0,5 г) каждого варианта кипятят в пробирках с дистиллированной водой 10 мин. Затем контрольный материал вынимают из кипящей воды и помещают одновременно с исследуемыми образцами для экзоосмоса в ячейки с 50 мл дистиллированной воды. Выход электролитов определяют по сопротивлению растворов при помощи реохордного моста Р-38. Для анализа результатов используют относительную электрическую проводимость (отношение проводимости живой ткани к проводимости тканей, убитых при кипячении, %). Результаты опыта записывают по следующей форме:

Вариант	Электрическая проводимость при			Вывод
	минус 7 °С	минус 9 °С	минус 15 °С	

Материалы и оборудование. Растения двух-трех сортов, различающихся по морозоустойчивости.

Холодильные камеры, весы, пробирки, реохордный мост Р-38, эксикаторы для закаливания растений.

**Работа 99. ВЕГЕТАЦИОННЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ
УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ВЫМОКАНИЮ**

Вводные пояснения. Вымокание — одна из главных причин гибели озимых зерновых культур в северо-западной зоне нашей страны. Вегетационный метод оценки образцов растений озимых на провокационном фоне позволяет характеризовать сорта по устойчивости к вымоканию.

Порядок работы. Образцы высевает в деревянные ящики размером 60×60×15 см, набитые почвой. В одном ящике размещают два-три сорта, каждый из которых занимает три ряда (45 растений). Осенью ящики размещают на стеллажах, а на зиму устанавливают в неглубокую (20 см) траншею, чтобы создать условия зимовки, близкие к полевым. Весной ящики устанавливают в сосуды с водой, которая должна полностью покрывать растения. Продолжительность затопления — 15 дней.

Срок окончания затопления определяют, наблюдая за состоянием растений устойчивого и неустойчивого сортов. Внешними показателями гибели всходов служат отмирание центрального листа, который легко отделяется от растения, сильное ослизнение и заиливание нижних листьев. При гибели более 55 % растений у неустойчивого сорта и значительном угнетении устойчивого затопление прекращают.

Показателем устойчивости к вымоканию служит количество растений, сохранившихся после окончания опыта (устанавливают количество растений до и после затопления). Более полное представление об устойчивости сортов к вымоканию дает сравнение урожая растений контрольного и затопляемого вариантов. Контрольные растения выращивают по той же методике в ящиках без затопления. Результаты опыта записывают по следующей форме:

Вариант	Количество выживших растений, %	Вывод

Материалы и оборудование. Образцы растений с различной устойчивостью к вымоканию.

Деревянные ящики размером 60×40×15 см, сосуды для выполнения затопления.

**Работа 100. РАННЯЯ ДИАГНОСТИКА УСТОЙЧИВОСТИ
РАСТЕНИЙ К ВЫМОКАНИЮ**

Вводные пояснения. Наибольшая чувствительность растений к избытку влаги проявляется на ранних этапах их развития, в период от набухания семян до прорастания. Поэтому оценить устойчивость к вымоканию можно по прорастанию семян в условиях избыточного увлажнения.

Порядок работы. Семена погружают в кюветы, заполненные водой слоем 3...4 см при температуре 22...24°C. На пятые сутки семена помещают в растильни для проращивания. Через шесть-семь суток подсчитывают нормально развившиеся проростки. Результаты опыта записывают по следующей форме:

Вид растения	Количество проросших семян, % общего числа	Вывод

Материалы и оборудование. Семена различных растений. Кюветы, растильни, шкаф для проращивания семян.

**Работа 101. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЯЗКОСТИ ПРОТОПЛАЗМЫ
КЛЕТОК РАСТЕНИЙ СОРТОВ,
РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ЖАРОСТОЙКОСТИ**

Вводные пояснения. При воздействии высоких температур клетки растений с высокой вязкостью и эластичностью протоплазмы способны противостоять повреждающим воздействиям в большей степени, чем клетки с протоплазмой незначительной вязкости и эластичности. Степень вязкости протоплазмы можно определить по времени, в течение которого вогнутый плазмоллиз переходит в выпуклый.

Порядок работы. Готовят поперечный срез листа (листа алоэ, эпидермиса лука или листьев другого мезофита), помещают на часовое стекло и в течение 5...10 мин окрашивают нейтральным красным (1:5000). После промывания срезы подсушивают фильтровальной бумагой и переносят на предметное стекло в каплю 1 М раствора сахарозы. Накрывают срезы покровным стеклом, края которого смазывают вазелином, чтобы избежать испарения воды. Наблюдая за срезами под микроскопом, отмечают время наступления вогну-

того и выпуклого плазмолизисов. По времени появления выпуклого плазмолиза судят о степени вязкости протоплазмы. Результаты опыта записывают по следующей форме:

Вид растения	Время наступления выпуклого плазмолиза	Относительная вязкость протоплазмы

Материалы и оборудование. Объекты исследований, нейтральный красный (1:5000), фильтровальная бумага, 1 М раствор сахарозы, вазелин.

Лезвия бритвы, предметные и покровные стекла, микроскопы, препаровальные иглы, часовые стекла или баночки с крышками на 50...100 мл.

Работа 102. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ ПО СТЕПЕНИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛОНОСНЫХ ТКАНЕЙ

Вводные пояснения. Один из наиболее простых наглядных методов диагностики состояния растений основан на образовании феофитина при действии различных повреждающих факторов. Суть метода заключается в том, что разрушающиеся мембраны изменяют свойства полупроницаемости и кислый клеточный сок проникает внутрь хлоропластов. Ион водорода вытесняет ион магния из молекулы хлорофилла, превращая последний в феофитин — вещество бурого цвета. Чем больше повреждены ткани, тем больше образуется бурых пятен.

Порядок работы. В водяной бане поддерживают температуру 40°C. В воду опускают листья испытуемых на жаростойкость растений. Первую пробу извлекают из бани через 30 мин и временно переносят в кристаллизатор с холодной водой. Затем температуру в бане поднимают на 5°C, через 10 мин берут вторую пробу и также переносят в холодную воду. Постепенно температуру воды доводят до 60°C, забирая пробы каждые 5°C, после чего пробы извлекают из воды и помещают в бюксы с 0,2 н. раствором соляной кислоты.

Через 20 мин учитывают результаты. Живые листья растений остаются зелеными, а мертвые буреют (у растений с кислым клеточным соком побурение происхо-

дит без обработки соляной кислотой). Результаты опыта записывают по следующей форме (крестиком отмечают температуру первых признаков и полного побурения):

Вариант	Температура, °С					Вывод
	40	45	50	55	60	

Материалы и оборудование. Листья растений, различающиеся по жаростойкости, 0,2 н. раствор соляной кислоты.

Водяная баня, термометр, кристаллизаторы с холодной водой, пинцеты.

Работа 103. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО ПОРОГА КОАГУЛЯЦИИ ЦИТОПЛАЗМЫ

Вводные пояснения. Для характеристики жаростойкости растений важно определить температурный порог коагуляции белков цитоплазмы. Гибель клеток устанавливают по потере ими способности плазмолизироваться.

Порядок работы. Готовят 12 срезов эпидермиса листа исследуемого растения (листья лука или традесканции) и помещают по два среза в пробирки с небольшим количеством воды. Нагревают в большой колбе воду. Смешивая горячую воду с холодной, в шести химических стаканах готовят водяные бани с температурой 48, 50, 52, 56 и 58 °С (на стаканах делают надписи восковым карандашом).

Пробирки со срезами одновременно погружают в подготовленные бани. В дальнейшем установленную температуру поддерживают, осторожно приливая в стаканы горячую воду. Через 10 мин срезы извлекают кисточкой из пробирок и переносят на предметные стекла, снабженные соответствующими надписями. Если клетка не содержит пигментов, их окрашивают нейтральным красным в течение 5...10 мин, затем отсасывают с предметного стекла раствор красителя фильтровальной бумагой, наносят на срезы по одной капле 1 М раствора сахарозы и накрывают покровными стеклами. Через 15...20 мин срезы рассматривают в микроскоп.

Делают выводы относительно температурного порога коагуляции изучаемых растений. Результаты записывают по следующей форме, обозначая знаками «+» и «-» наличие и отсутствие плазмолиза:

Объект	Плазмолиз при температуре, °С					
	48	50	52	54	56	58

Материалы и оборудование. Листья лука или традесканции, раствор нейтрального красного (1:5000), фильтровальная бумага, 1 М раствор сахарозы.

Лезвия бритвы, пробирки, колбы на 500 мл, химические стаканы на 200 мл, карандаши по стеклу, термометры, кисточки, предметные и покровные стекла, микроскопы.

Работа 104. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОУДЕРЖИВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ РАСТЕНИЙ

Вводные пояснения. Способность растений разных видов и сортов выносить обезвоживание можно определить, используя эксикаторный метод, предложенный П. А. Генкелем.

Порядок работы. Из листьев бритвой вырезают полоски длиной 3...4 см, помещают в бюксы и выдерживают в течение 2...3 ч в эксикаторе над серной кислотой (1:1). Затем из каждой полоски готовят по одному срезу эпидермиса, окрашивают нейтральным красным (1:5000) и плазмолизируют 1 М раствором сахарозы. Подсчитывают число живых клеток (плазмолизированных) в поле зрения микроскопа. По каждому срезу подсчет ведут в двух полях зрения. Результаты опыта записывают по следующей форме:

Вариант	Количество плазмолизированных клеток, % общего количества клеток	Вывод

Материалы и оборудование. Растения сортов пшеницы, ячменя, овса, проса, кукурузы, различающихся по способности удерживать воду; серная кислота; нейтральный красный (1:5000); 1М раствор сахарозы.

Ножницы, лезвия бритвы, эксикаторы, предметные и покровные стекла.

Работа 105. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ПРОРАЩИВАНИЕМ СЕМЯН НА РАСТВОРАХ САХАРОЗЫ

Вводные пояснения. Способность растений на первых этапах развития экономно использовать влагу в условиях недостаточного водоснабжения служит одним из важных биологических и хозяйственно полезных признаков сорта. Определяя количество проросших семян на растворах с высоким осмотическим давлением, имитирующем условия физиологической сухости, представляется возможным определить на ранних этапах онтогенеза относительную засухоустойчивость видов и сортов.

Порядок работы. В чашках Петри на фильтровальной бумаге проращивают по 50 семян в трех повторностях. Фильтровальную бумагу увлажняют раствором сахарозы с осмотическим давлением 10, 14 и 18 атм. Подсчет проросших семян осуществляют на третий и седьмой день. Результаты опыта записывают по следующей форме:

Вариант	Число семян, проросших на третий день	Число семян, проросших на седьмой день	Вывод

Материалы и оборудование. Семена пшеницы, проса, гороха, вики, кукурузы, ячменя; растворы сахарозы с осмотическим давлением 10, 14, 18 атм.

Чашки Петри, фильтровальная бумага, термостат.

Работа 106. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ПО СОДЕРЖАНИЮ ПРОЧНОСВЯЗАННОЙ ФРАКЦИИ ХЛОРОФИЛЛА *a* и *b*

Вводные пояснения. Устойчивость растений к засухе тесно связана с состоянием пигментного комплекса. При повышении температуры и ухудшении влагообеспеченности повышается активность хлорофиллазы, разрушающей хлорофилло-белково-липидный комплекс. Обнаруживая результат деятельности этого фермента, можно установить относительную устойчивость растений к засухе. Метод основан на определении прочно-связанной фракции хлорофиллов *a* и *b*, которые экст-

рагируют при помощи полярных (ацетон) и неполярных (бензин) растворителей с последующим спектрофотометрированием.

Порядок работы. Двухнедельные проростки различных по засухоустойчивости сортов оставляют в одной серии сосудов без полива, в другой серии — выращивают при влажности почвы 60 % НВ. После наступления у растений первой серии устойчивого завядания отбирают пробы листьев, в которых определяют содержание пигментов.

Для этого берут от четырех-пяти растений листья верхнего яруса, измельчают их (можно брать высечки пробочными сверлами диаметром 6 мм), тщательно перемешивают и из средней пробы взвешивают три навески на аналитических весах по 200 мг каждая. Навески переносят в ступки, добавляют CaCO_3 и растирают. Затем добавляют небольшими порциями 80%-й раствор ацетона и растирают окончательно до однородной консистенции.

Содержимое ступки количественно переносят на фильтры Шота № 3 и № 4 и фильтруют при помощи вакуумного насоса в колбу Бунзена (в колбе Бунзена устанавливают сахарную воронку, пробирку на 20 мл для удобства извлечения фильтрата), тщательно вымывая пигменты из осадка ацетоном. Затем фильтрат из пробирки переносят в мерную колбу на 50 мл. Фильтрат доводят до заданного объема, на спектрофотометре (СФ-4 или СФ-16), определяют величины экстинкции для хлорофилла a и b при соответствующей длине волны (для a — E_{663} , для b — E_{645}).

Расчет выполняют по формулам:

$$C_a = 12,7E_{663} - 2,69E_{645};$$

$$C_b = 22,9E_{645} - 4,63E_{663};$$

$$C = C_a + C_b = 8,02E_{663} + 20,2E_{645},$$

где C_a — концентрация хлорофилла a ; C_b — концентрация хлорофилла b ; C — сумма концентраций хлорофиллов a и b .

Определяют концентрацию хлорофилла (мг/л). Для расчета содержания пигментов в 1 г сырого вещества используют формулу

$$M_{\text{хл}} = \frac{K \cdot V}{P},$$

где K — это C_a , C_b или C ; V — объем разведения; P — навеска.

Для пересчета содержания пигментов на 1 г сухого вещества листьев составляют пропорции с использованием уже известных величин количества хлорофилла в 1 г навески сырого вещества. Результаты опыта записывают по следующей форме:

Вариант	Содержание пигментов на 1 г сухого вещества	Вывод

Материалы и оборудование. Растения двух-трех сортов, различающихся по засухоустойчивости, СаСО₃, 80%-й раствор ацетона, Пробочные сверла диаметром 6 мм, ножницы, ступки, фильтры Шота, вакуумный насос, колбы Бунзена, сахарные пробирки на 20 мл, мерные колбы на 50 мл, спектрофотометр.

Работа 107. ДИАГНОСТИКА ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ И ЖАРОСТОЙКОСТИ РАСТЕНИЙ ПО ИЗМЕНЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ СТАТОЛИТНОГО КРАХМАЛА

Вводные пояснения. Метод определения устойчивости по изменению содержания статолитного крахмала применяют в селекции. Статолитный крахмал, находящийся в корневом чехлике, почти не расходуется в процессе жизнедеятельности растительного организма, в связи с этим содержание его в растении довольно постоянно. Однако при воздействии повышенной температурой или обезвоживанием происходит гидролиз этого крахмала (в большей степени у менее устойчивых растений). Определяя количество оставшегося крахмала, можно судить об устойчивости сорта.

Порядок работы. Семена проращивают на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри при 25°C. Для определения устойчивости растений к засухе двух-трехдневные проростки подсушивают в эксикаторах над раствором глицерина (100 мл воды + 37 мл глицерина) в течение 24 ч при 16...17°C или над раствором NaCl (8 г соли на 100 мл воды) в течение 24 ч при 20...21°C. Опыт проводят в темноте.

Для определения жаростойкости проростки выдерживают в воде при 37°C в течение 1 ч. По окончании прогрева или подсушивания у главного корня бритвой срезают кончики длиной 2...3 мм и окрашивают их раствором Люголя (1%-й раствор йода в йодиде калия) 30 с. В качестве контроля окрашивают кончики

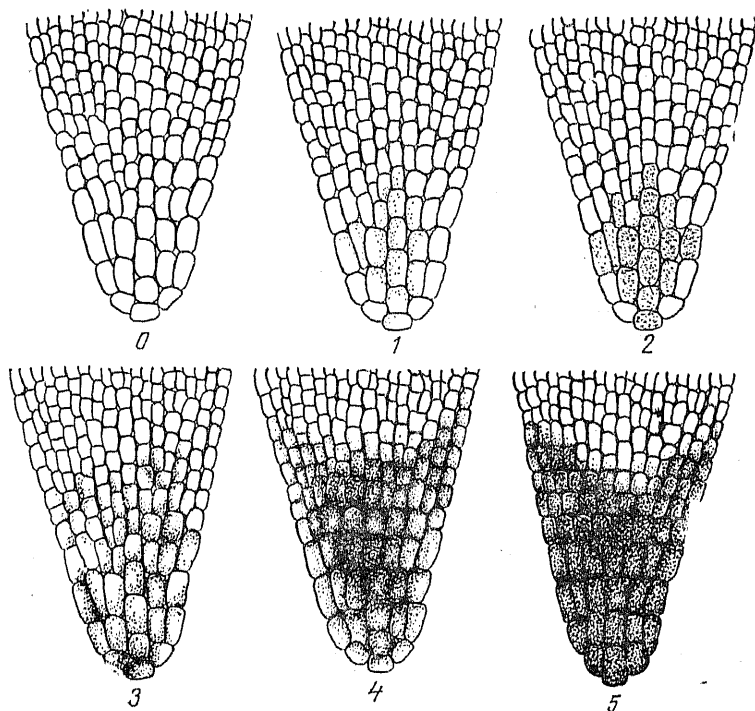


Рис. 31. Содержание крахмала в корневом чехлике (0...5 баллов)

корня растений, не подвергавшихся нагреванию или обезвоживанию.

После окраски корни сразу же просматривают под микроскопом. Чем более устойчивы растения, тем больше крахмала гидролизовалось в их клетках. Оценку дают в баллах или в процентном отношении к контролю (рис. 31). Образцы по устойчивости разделяют на три группы: высокоустойчивые — гидролизуетсся до 35 % крахмала, среднеустойчивые — 36...50 %, неустойчивые — более 50 %. Результаты опытов записывают по форме (табл. 78), подписывая под сортообразцами принадлежность к той или иной группе.

Материалы и оборудование. Семена овса, ячменя, проса, люпина; фильтровальная бумага; раствор глицерина; раствор NaCl; раствор Люголя.

Микроскоп, чашки Петри, эксикаторы, термостат, ножницы, секундомеры.

78. Определение засухоустойчивости и жаростойкости растений

Сорт	Гидролиз статолитного крахмала в корневом чехлике, % контроля			Группа устойчивости
	1	2	3	

Засухоустойчивость

1
2
3

Жаростойкость

1
2
3

Работа 108. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ КРАХМАЛЬНОЙ ПРОБЫ

Вводные пояснения. Засухоустойчивые растения сохраняют более высокую синтетическую способность при действии засухи и содержат больше крахмала, чем растения с низкой устойчивостью.

Порядок работы. В опытах сравнивают партии растений одного вида, получившие различную обработку, изменившую их засухоустойчивость.

В солнечную погоду в 11...12 ч дня, когда в листьях скапливается значительное количество крахмала, срывают с опытных растений пять—десять листьев одного яруса и оставляют их в тени на 2...3 ч. Затем каждый лист или его часть (4...5 см) обесцвечивают спиртом и определяют содержание крахмала, действуя раствором Люголя.

Результаты (среднее арифметическое) выражают в баллах: 1 — крахмала нет, 2 — крахмал есть, 3 — крахмала много. Результаты опыта записывают в следующей форме:

Вариант	Количество крахмала, баллы	Вывод

Материалы и оборудование. Листья растений, различающихся по засухоустойчивости; спирт; раствор Люголя.

Пинцет, химические стаканы.

**Работа 109. БИОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ РАСТЕНИЙ,
РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ**

Вводные пояснения. Данный метод основан на неповреждающем импульсном температурном воздействии на растительную ткань и анализе ответной биоэлектрической реакции, возникающей в ней при этом воздействии.

Порядок работы. Растения двух-трех сортов пшеницы выращивают в условиях дефицита влаги (25...35 % НВ) или создают водный дефицит непосредственно перед началом анализа. Отбирают листья верхних ярусов, свободно укладывают их нижней стороной на поверхности термостоллика и фиксируют прижимной лапкой.

Отведение биопотенциалов выполняют при помощи солевых мостиков (полоски фильтровальной бумаги шириной 3...4 мм и длиной 80 мм), которые пинцетом укладывают поперек пластины листа на расстоянии 1,5...2 см друг от друга. Биоэлектрическая реакция в данном случае представляет собой экспериментально вызванное изменение разности электрических потенциалов между двумя участками листа, один из которых подвергается импульсному термораздражению. Во время работы необходимо следить, чтобы не было разрыва солевых мостиков.

При кратковременном импульсном температурном воздействии возникает сигнал, который далее поступает на усилитель, а затем на самописец. По ходу записи биоэлектрического ответа оценивают временные параметры: латентный период, продолжительность импульса, время нарастания импульса, время восстановления разности потенциалов до исходного уровня. Учитывают и амплитуду импульса.

Различия в реакции сортов пшеницы на ухудшение водообеспечения наиболее отчетливо проявляются в фазы выхода в трубку и цветения. Изменения биоэлектрической реакции листьев носят двоякий характер: при незначительном обезвоживании амплитуды биоэлектрических ответов возрастают, более глубокая засуха вызывает снижение этих показателей. У засухоустойчивых сортов пшеницы в фазе выхода в трубку снижение амплитуды биоэлектрической реакции происходит при уменьшении оводненности листьев на

6...7 % по сравнению с контролем, у неустойчивых — на 3...4 %. Чем менее устойчивы сорта пшеницы, тем резче изменения амплитуды пика биоэлектрической реакции и его временных параметров.

На основе полученных данных делают выводы об относительной засухоустойчивости сортов.

Материалы и оборудование. Растения пшеницы двух-трех сортов, различающихся по засухоустойчивости или жаростойкости.

Полупроводниковый термостойлик типа ТОС-11, два неполяризующихся хлорсеребряных электрода типа ЭВЛ-1МЗ, усилитель биопотенциалов рН-340, самописец, блок питания нагревательного элемента электронного реле времени.

Работа 110. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖАРСТОЙКОСТИ КУЛЬТУР ПО СОПРОТИВЛЕНИЮ ИХ ТКАНЕЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОМУ ТОКУ

Вводные пояснения. Основное сопротивление электрическому току оказывают клеточные мембраны. При воздействии повышенных температур может происходить обратимое или необратимое повреждение мембран, в результате чего резко падает сопротивление мембран электрическому току. Однако падение сопротивления наблюдается в том случае, если лист погибает быстро и удастся избежать интенсивной потери воды тканью. В естественных условиях растения, как правило, повреждаются от действия высоких температур постепенно, практически параллельно происходит медленное обезвоживание ткани, в результате чего сопротивление электрическому току возрастает. Метод дает возможность выполнять исследования в полевых условиях и в теплицах, практически не повреждая растения.

Порядок работы. Сопротивление тканей листьев переменному току определяют, вводя электроды в ткани листьев трех растений по вариантам в самые жаркие часы дня (с 12 до 16 ч). Расстояние между электродами должно составлять 10 мм. Электрическое сопротивление измеряют при помощи моста переменного тока Р-556 или Р-557 в трех точках листа (по два измерения). Листья берут с одного яруса (третий-четвертый лист сверху), в трехкратной повторности, т. е. по одному листу с каждого из трех растений.

Чем больше растение повреждается высокой температурой, чем выше обезвоживание, тем выше сопротивление электрическому току. В том случае, когда высо-

кая температура повреждает клетки растений, а потеря воды сильно ограничена из-за высокой относительной влажности воздуха (такие условия могут быть в теплицах), сопротивление тканей электрическому току, наоборот, падает. Результаты опыта записывают по следующей форме:

Вариант	Электрическая проводимость тканей	Вывод

Материалы и оборудование. Растения одного-двух сортов, различающихся по жаростойкости.

Стальные электроды, мост переменного тока (Р-556 или Р-557).

Работа 111. ОЦЕНКА ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ АУКСАНОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ ПО ШЕВЕЛУХЕ

Вводные пояснения. Из всех физиологических процессов в растениях наиболее чувствителен к недостатку влаги рост. При поливе подвядших растений засухоустойчивых сортов ответная реакция, выражающаяся в интенсификации ростовых процессов, проявляется наиболее ярко по сравнению с незасухоустойчивыми сортами.

Рост растений злаковых культур в высоту можно регистрировать при помощи ауксанографа, изготовленного из метеорологических приборов — термографа, гигрографа, барографа с суточным заводом (рис. 32). Датчиком изменения высоты растения в приборе служит небольшой металлический зажим с прокладками, который прикрепляют к верхушке растущего органа растения.

От зажима ростовые движения передаются через стальную проволоку и рычаг на перо самописца. Отношение длины большого плеча к короткому составляет степень увеличения фактических приростов при их записи. Натяжение стальной проволоки регулируют подбором соответствующих противовесов в зависимости от прочности органов и мощности развития растений. Противовесы создают необходимое натяжение стальной проволоки, обеспечивая устойчивую работу самописца.

Порядок работы. Растения выращивают в вегетационных сосудах две-три недели. Для исследований ис-

пользуют два-три сорта, различающихся по засухоустойчивости. Исходная влажность почвы перед началом опыта должна составлять 18...20 % НВ. Зажимы ауксанографа прикрепляют к растениям и через 15...20 мин одновременно поливают их одинаковым количеством воды. Через 3 ч снимают ауксанограмму, измеряют по-

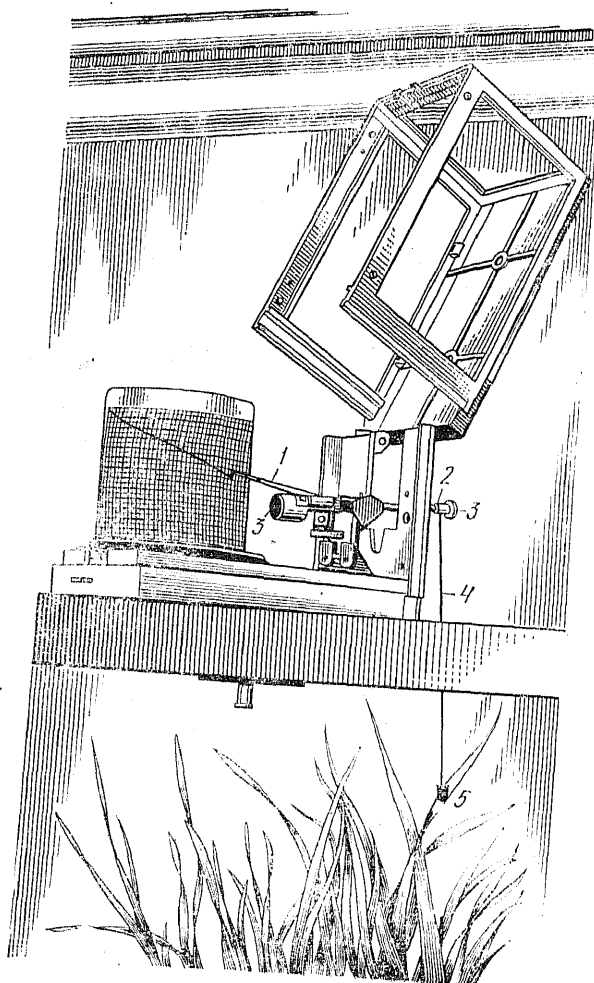


Рис. 32. Ауксанограф:

1 — перо самописца; 2 — рычаг; 3 — противовесы;
4 — стальная проволока; 5 — зажим

казатели, описывают ауксаногаммы вариантов. Результаты опытов записывают по следующей форме:

Вариант	Линейный прирост растений, мм	Время наблюдения соответной реакции, ч	Выводы

Материалы и оборудование. Растения пшеницы, кукурузы. Ауксанограф, вегетационные сосуды, сосуды для полива растений.

Работа 112. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Вводные пояснения. При действии неблагоприятных условий (сильные морозы, засуха) возникает необходимость быстро определить жизнеспособность растений. Прижизненная диагностика физиологического состояния древесных растений — важная задача плодоводства и лесоводства. Электрофизиологические методы позволяют выполнять эту задачу без хирургического вмешательства. Жизнеспособные растения характеризуются более высокой электрофизиологической активностью по сравнению с нежизнеспособными.

Порядок работы. В качестве объектов исследования используют семена яблони или груши. За несколько дней до эксперимента прекращают полив растений в половине сосудов. При появлении устойчивого завядания измеряют биопотенциалы завядших и контрольных растений.

Биопотенциалы отводят от растений при помощи каломельных и хлорсеребряных электродов. Электроды подводят к объекту через стеклянные звенья, заполненные 3%-м раствором агар-агара на 3 М растворе КСl. Стеклянные звенья соединяют с электродами солевыми мостиками, заполненными 3 М раствором КСl. Контакт с растениями соединительных звеньев осуществляют через хлопчатобумажные фитили, смоченные водопроводной водой (подробное описание электродов и экспериментальной установки приведено в разделе практикума, посвященном электрофизиологии). Ответная биоэлектрическая реакция на раздражение отводится от основания верхушечной и нижерасположенной почек.

Измерение выполняют через 25...30 мин после присоединения электродов к растению. С отводящих электродов ответная биоэлектрическая реакция подается на усилитель постоянного тока (рН-340), соединенный с самописцем. Раздражение осуществляют при помощи биостимулятора. Регистрируют ответную биоэлектрическую реакцию (БЭР), измеряют ее параметры и записывают результаты по следующей форме:

Вариант	Амплитуда БЭР, мВ	Продолжительность БЭР, с	Вывод

Материалы и оборудование. Сеянцы яблони и груши, агар-агар, 3 М раствор KCl.

Хлорсеребряные или каломельные электроды со стеклянными переходными звеньями, хлопчатобумажные фитили, усилители рН-340, самописцы.

Работа 113. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПЫЛЬЦЫ ПО ШАРДАКОВУ

Вводные пояснения. У растений засухоустойчивых сортов пыльца более жизнеспособна. Ухудшение водообеспечения снижает жизнеспособность пыльцы у устойчивых растений в меньшей степени, чем у неустойчивых, что определяется по наличию в пыльцевых зернах пероксидазной активности. Пыльцевые зерна, характеризующиеся сравнительно высокой активностью пероксидазы, окрашиваются в красноватый или малиновый цвет. Нежизнеспособная пыльца (с низкой пероксидазной активностью или отсутствием таковой) окрашивается в желтоватый цвет или остается бесцветной.

Порядок работы. На предметное стекло кисточкой наносят нативную пыльцу, предварительно подсушенную при 26 °С в течение 20 ч. К пыльце при помощи стеклянной палочки добавляют смесь четырех растворов в равных объемах: 3-бензидина основного, α -нафтола, Na_2CO_3 и перекиси водорода.

Пыльцу и раствор перемешивают препаровальной иглой и накрывают покровным стеклом. Если под покровным стеклом накопилось много пузырьков воздуха, препарату дают постоять некоторое время. Через 3...4 мин исследуют пыльцу при малом увеличении микроскопа. По окраске пыльцевых зерен делают вы-

вод о жизнеспособности пыльцы. Результаты опыта записывают по следующей форме:

Вариант	Жизнеспособность пыльцы, %	Вывод

Материалы и оборудование. Пыльца пшеницы, предметные и покровные стекла; 3-бензидин основной (0,2 г в 100 мл 50%-го раствора этилового спирта), α -нафтол (0,2 г в 100 мл дистиллированной воды), Na_2CO_3 (0,25 г в 100 мл дистиллированной воды), 3%-й раствор перекиси водорода.

Микроскопы, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла.

Работа 114. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ЗЕРНОВЫХ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР К ТОКСИЧНОСТИ КИСЛЫХ ПОЧВ

Вводные пояснения. В почвах, имеющих кислую реакцию, присутствует в избытке алюминий. Обычно он находится в связанном состоянии и переходит в раствор при pH меньше 5,5, превращаясь в подвижный катион Al^{3+} . Последний токсичен для растений и служит основным фактором, лимитирующим урожайность на кислых почвах. Оценка устойчивости растений к кислым почвам чрезвычайно важна в селекции.

Порядок работы. Семена ярового ячменя Московский 121 (эталонный, относительно устойчивый сорт) проращивают в чашках Петри на фильтровальной бумаге при 25...26°C. Когда корни достигнут в длину в среднем 15 мм, выполняют их точный замер и растения переносят в растильни с половинной нормой питательного раствора Кнопа, обогащенного микроэлементами. В питательную смесь добавляют 28 мг/л Al^{3+} . Растения выращивают в течение семи — десяти дней. Затем снова измеряют длину корней. У растений устойчивого сорта Московский 121 корни обычно удлиняются на 8...15 мм, у неустойчивых прирост значительно меньше. Делают вывод об устойчивости изучаемых сортов к токсичности кислых почв.

Материалы и оборудование. Растения ячменя сорта Московский 121 и двух-трех других сортов.

Шкаф для проращивания семян; питательный раствор Кнопа, обогащенный микроэлементами; растильни; линейки; соли — $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ или $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Работа 115. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ ЗЛАКОВ ПО РОСТОВЫМ ПРОЦЕССАМ

Вводные пояснения. В условиях избыточной засоленности почвы часто снижается всхожесть семян и интенсивность роста растений. При определении солеустойчивости растений данным методом показателем устойчивости служит количество проросших семян в растворах соли по сравнению с дистиллированной водой.

Порядок работы. Подбирают здоровые выполненные семена желательного одной репродукции. Отобранные семена каждого вида и сорта помещают отдельно в марлевые мешочки с этикеткой внутри и обрабатывают раствором формалина (1 мл на 300 мл воды) в течение 3...5 мин. Затем слегка просушивают и раскладывают по 25...50 семян на одну чашку Петри. Предварительно чашки Петри и фильтровальную бумагу прокалывают в термостате при 150°C в течение 1 ч, на дно их укладывают слой фильтровальной бумаги и в каждую чашку наливают требуемое количество раствора соли необходимой концентрации, а для контрольного варианта — дистиллированную воду. На каждый вариант берут по две чашки. Условия проращивания семян различных культур приведены в таблице 79.

79. Условия проращивания семян

Культура	Число семян на одну чашку	Объем раствора NaCl на одну чашку, мл	Концентрация раствора NaCl, %	Длительность опыта, дней	Температура, °C
Ячмень	50	6...7	10	5...6	22±2
Кукуруза	25...50	8...10	7	6...7	22±2
Кормовые злаки	50...100	4...5	7	6...7	22±2

Семена в чашках Петри помещают в термостат для проращивания. На дно термостата ставят кювету с водой. По окончании проращивания по каждому варианту определяют число проросших семян (среднее из двух повторностей). Число проросших семян в дистиллированной воде принимают за 100 %, а число семян, проросших в растворах соли, вычисляют в процентах контроля. Результаты опыта записывают по следующей форме:

Вариант	Число проросших семян	Вывод

Материалы и оборудование. Семена растений различной солеустойчивости, раствор формалина, растворы NaCl различной концентрации (см. табл. 79).

Чашки Петри, марлевые мешочки, термостат.

Работа 116. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ПО КОЛИЧЕСТВУ АЛЬБУМИНОВ В ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЬЯХ

Вводные пояснения. Высокое содержание альбуминов в листьях служит показателем большой солеустойчивости растений.

Порядок работы. Навеску свежих листьев исследуемых растений (2 г) растирают с 10 мл воды, вытяжку очищают от взвесей центрифугированием или фильтрованием. Затем 5 мл вытяжки вносят в градуированную центрифужную пробирку и добавляют в нее сухой сульфат аммония до полного насыщения (примерно 15 г). Через 15 мин после растворения соли выпавшие в виде геля альбумины центрифугируют 3 мин при интенсивности вращения $4000..5000 \text{ мин}^{-1}$ и учитывают объемное (по делениям пробирки) количество альбуминов. Результаты записывают по следующей форме:

Вариант	Содержание альбуминов, мл	Вывод

Материалы и оборудование. Два-три сорта растений, различающихся по солеустойчивости; сухой $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Ступки с пестиками, колбы на 50 мл, воронки с фильтром, центрифуги, весы, пипетки на 10 мл, градуированные центрифужные пробирки.

Работа 117. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ПО СТЕПЕНИ ВЫЦВЕТАНИЯ ХЛОРОФИЛЛА ПО ГЕНКЕЛЮ

Вводные пояснения. При ухудшении влагообеспечения растений под воздействием солей происходит деструкция хлоропластов, нарушается синтез хлорофиллов *a* и *b*, изменяется прочность связей в хлорофилло-белко-

во-липидном комплексе пластид. Определить солеустойчивость растений можно по скорости и степени выцветания хлорофилла.

Порядок работы. Листья растений двух-трех сортов, различающихся по солеустойчивости, срезают под водой у основания черешка (используют листья одного яруса). Контрольные листья помещают черешками в воду, опытные — в 2...4%-е растворы NaCl или Na_2SO_4 и выдерживают на рассеянном свете семь суток.

Под влиянием солей в результате разрушения хлорофилло-белково-липидного комплекса происходит постепенное выцветание хлорофилла (изменение общей окраски листьев или появление бледных участков — солевых пятен, площадь которых за время опыта увеличивается). Изменение окраски листьев отмечают на третьи и седьмые сутки. У несолеустойчивых сортов выцветание хлорофилла идет и на большей площади. Результаты опытов записывают по следующей форме:

Вариант	Изменение окраски листьев		Вывод
	на третий день	на седьмой день	

Материалы и оборудование. Растения сортов различной солеустойчивости, 2...4%-е растворы NaCl или Na_2SO_4 .

Кристаллизаторы, химические стаканы на 100 мл.

Работа 118. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР К ПОЛЕГАНИЮ ПО АНАТОМИЧЕСКОМУ СТРОЕНИЮ СТЕБЛЯ

Вводные пояснения. Полегание значительно снижает урожайность зерновых культур. Полеганию обычно предшествуют постепенно нарастающие неблагоприятные изменения анатомо-морфологического и физиологического порядка. Сопоставление морфологических и анатомических характеристик растений при полегании позволяет выявить меру реакции растения на условия произрастания. Для прогноза полегания определяют плотность опорных тканей устойчивых и неустойчивых к нему сортов.

Порядок работы. У двух-трех сортов, различающихся по устойчивости к полеганию, делают поперечные срезы из нижней части двух первых междоузлий глав-

ного стебля в фазе восковой или молочной спелости. На предметном стекле препараты окрашивают 1%-м раствором сафранина. При помощи окуляра-микрометра (при окуляре 6 и объективе 10) измеряют толщину выполненной части стебля, толщину склеренхимного кольца и подсчитывают: количество рядов клеток, из которых состоит склеренхимное кольцо; количество сосудисто-волокнистых пучков в паренхиме и склеренхиме.

Результаты опытов записывают по следующей форме:

Сорт	Толщина стебля, мм	Толщина склерен- химного кольца, мкм	Число рядов клеток склерен- химы	Число сосудисто- волокнистых пучков в склеренхиме	Число сосудисто- волокнистых пучков в паренхиме

Материалы и оборудование. Растения пшеницы двух-трех сортов, различающихся по устойчивости к полеганию, лезвия бритвы, раствор сафранина, окуляры-микрометры, микроскопы, предметные и покровные стекла.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Рефрактометрические показатели, концентрация и осмотическое давление растворов сахарозы (для рефрактометра РПЛ)

Показатель шкалы рефракто- метра	Концентрация		Осмоти- ческое давление, кПа	Показатель шкалы рефракто- метра	Концентрация		Осмоти- ческое давление, кПа
	% по массе	моль			% по массе	моль	
1	2	3	4	5	6	7	8
0,0	0,00	0,000	0,0	4,0	38	40	107,4
1	03	01	2,0	1	42	42	112,4
2	07	02	4,0	2	45	43	114,5
3	11	03	6,1	3	49	44	117,5
4	14	04	9,1	4	52	45	120,5
5	18	05	12,2	5	56	46	122,6
6	21	06	13,2	6	59	47	125,6
7	25	07	18,3	7	63	48	128,6
9	32	09	21,3	8	66	49	130,7
				9	70	50	133,7
1,0	35	10	26,3	5,0	73	51	136,7
1	39	11	28,4	1	76	52	138,8
2	42	12	31,4	2	80	53	141,8
3	46	13	34,4	3	83	54	144,8
4	49	14	36,5	4	87	55	146,9
5	53	15	39,5	5	90	56	149,9
6	56	16	42,5	6	93	57	152,9
7	60	17	44,6	7	97	58	155,0
8	63	18	47,6	8	2,00	59	158,0
9	66	19	50,6	9	03	60	161,1
2,0	70	20	53,7	6,0	07	61	163,1
1	73	21	56,7	1	10	62	166,1
2	77	22	58,7	2	14	63	169,1
3	80	23	61,8	3	17	64	172,2
4	84	24	63,8	4	21	65	175,2
5	87	25	66,8	5	24	66	178,3
6	90	26	69,9	6	27	67	180,3
7	94	27	71,9	7	31	68	183,3
8	97	28	74,9	8	34	69	185,4
9	1,00	29	78,0	9	38	70	187,4
3,0	04	0,030	81,0	7,0	41	71	190,4
1	07	31	83,1	1	41	72	193,4
2	11	32	85,1	2	48	73	196,5
3	14	33	88,1	3	51	74	199,6
4	18	34	90,2	4	55	75	201,6
5	21	35	93,2	5	58	76	204,6
6	24	36	96,2	6	61	77	207,7
7	27	37	98,3	7	65	78	209,7
8	31	38	101,3	8	68	79	211,7
9	35	39	104,3	9	72	80	213,7

1	2	3	4	5	6	7	8
8,0	75	81	216,8	13,0	44	32	357,6
1	78	82	219,8	1	47	33	358,6
2	82	83	222,9	2	51	34	361,6
3	85	84	225,9	3	54	35	364,7
4	89	85	227,9	4	57	36	366,7
5	92	86	230,9	5	61	37	368,7
6	95	87	234,0	6	64	38	371,7
7	90	88	236,0	7	67	39	373,8
8	3,02	89	239,1	8	70	40	376,8
9	06	90	242,1	9	74	41	379,9
9,0	09	0,091	244,1	14,0	77	42	381,9
1	12	92	247,2	1	80	43	384,9
2	16	93	250,2	2	84	44	387,9
3	19	94	252,2	3	87	45	390,0
4	23	95	255,3	4	91	46	393,0
5	26	96	258,3	5	94	47	396,1
6	29	97	260,3	6	97	48	398,1
7	33	98	263,4	7	5,01	49	400,1
8	36	99	266,4	8	04	50	403,2
9	40	0,100	268,4	9	08	51	405,2
10,0	43	01	271,5	15,0	11	52	408,2
1	46	02	274,5	1	14	53	411,3
2	50	03	276,5	2	18	54	413,3
3	53	04	279,6	3	21	55	416,3
4	57	05	282,6	4	24	56	419,4
5	60	06	284,6	5	28	57	421,4
6	63	07	287,7	6	31	58	424,5
7	67	08	290,7	7	34	59	427,5
8	70	09	292,7	8	37	60	429,5
9	74	11	298,8	9	41	61	432,5
11,0	77	12	300,8	16,0	44	62	435,6
1	80	13	303,9	1	47	63	437,6
2	84	14	306,9	2	51	64	440,6
3	87	15	309,0	3	54	65	443,7
4	91	16	312,0	4	57	66	445,7
5	94	17	315,0	5	61	67	448,8
6	97	18	317,1	6	64	68	451,8
7	4,01	19	320,1	7	67	69	453,8
8	04	20	323,1	8	70	70	456,9
9	08	21	325,2	9	73	71	459,9
12,0	11	22	328,2	17,0	77	72	461,9
1	14	23	331,2	1	80	73	464,9
2	18	24	334,3	2	83	74	468,0
3	21	25	337,3	3	87	75	470,0
4	24	26	340,4	4	90	76	473,1
5	27	27	342,4	5	93	77	476,1
6	31	28	345,4	6	96	78	478,1
7	34	29	348,5	7	99	79	480,2
8	37	30	350,5	8	6,03	80	483,2
9	41	31	353,5	9	06	81	485,2

1	2	3	4	5	6	7	8
18,0	09	82	488,3	23,0	73	32	624,0
1	12	83	491,3	1	76	33	627,0
2	16	84	493,3	2	79	34	630,1
3	19	85	495,4	3	83	35	634,1
4	22	86	498,4	4	86	36	638,2
5	26	87	500,4	5	89	37	643,2
6	29	88	503,5	6	92	38	644,3
7	32	89	506,5	7	95	39	646,3
8	35	90	508,5	8	99	40	649,3
9	39	91	510,5	9	8,02	41	652,4
19,0	42	92	513,6	24,0	05	42	655,4
1	45	93	515,6	1	08	43	658,4
2	48	94	518,6	2	11	44	661,5
3	52	95	521,7	3	15	45	663,5
4	55	96	523,7	4	18	46	666,5
5	58	97	525,7	5	21	47	669,6
6	61	98	528,8	6	24	48	671,6
7	64	99	530,8	7	27	49	675,6
8	68	0,200	533,8	8	31	50	677,7
9	71	01	536,9	9	34	51	679,7
20,0	74	02	538,9	25,0	37	52	682,8
1	77	03	541,9	1	40	53	685,8
2	81	04	545,0	2	43	54	688,8
3	84	05	547,0	3	47	55	691,9
4	87	06	551,1	4	50	56	694,9
5	91	07	555,1	5	53	57	696,9
6	94	08	558,2	6	56	58	699,9
7	97	09	561,2	7	59	59	703,0
8	7,00	10	563,2	8	63	60	705,0
9	04	11	566,3	9	66	61	708,1
21,0	07	12	569,3	26,0	69	62	711,1
1	10	13	571,3	1	72	63	714,2
2	14	14	574,4	2	75	64	718,2
3	17	15	577,4	3	78	65	722,3
4	20	16	580,5	4	81	66	725,3
5	24	17	582,5	5	85	67	728,3
6	27	18	585,5	6	88	68	731,4
7	30	19	587,5	7	91	69	734,4
8	33	20	590,6	8	94	70	737,5
9	37	21	593,6	9	97	71	739,5
22,0	40	22	595,6	27,0	9,00	72	742,5
1	43	23	598,7	1	03	73	745,6
2	47	24	601,7	2	06	74	748,6
3	50	25	603,7	3	09	75	751,6
4	53	26	606,8	4	12	76	754,7
5	56	27	609,8	5	16	77	756,7
6	60	28	611,8	6	19	78	759,7
7	63	29	614,9	7	22	79	762,8
8	66	30	617,9	8	25	80	764,8
9	70	31	20,9	9	28	81	767,8

1	2	3	4	5	6	7	8
28,0	31	82	770,9	33,0	87	31	917,8
1	34	83	773,9	1	90	32	920,8
2	37	84	776,9	2	93	33	923,8
3	41	85	780,0	3	96	34	926,9
4	44	86	782,0	4	99	35	929,9
5	47	87	786,1	5	11,03	36	933,0
6	51	88	788,1	6	06	37	936,0
7	53	89	791,1	7	09	38	938,0
8	57	90	794,2	8	12	39	941,1
9	60	91	797,2	9	15	40	944,1
29,0	63	92	800,3	34,0	18	41	947,1
1	66	93	803,3	1	21	42	950,2
2	69	94	807,4	2	24	43	953,2
3	72	95	810,4	3	27	44	956,3
4	75	96	813,4	4	30	45	959,3
5	79	97	816,5	5	34	46	962,3
6	82	98	819,5	6	37	47	965,4
7	85	99	822,6	7	40	48	968,4
8	88	0,300	824,6	8	43	49	971,5
9	91	01	827,6	9	46	50	974,5
30,0	94	02	830,6	35,0	49	51	977,5
1	97	03	833,7	1	52	52	981,6
2	10,00	04	836,7	2	55	53	984,6
3	03	05	839,8	3	58	54	987,7
4	06	06	841,8	4	61	55	990,7
5	10	07	844,8	5	65	56	993,7
6	13	08	846,9	6	68	57	996,8
7	16	09	848,8	7	71	58	999,8
8	19	09	850,9	8	74	59	1002,9
9	22	10	852,9	9	77	60	1005,9
31,0	25	11	855,9	36,0	80	61	1008,9
1	28	12	859,0	1	83	62	1012,0
2	31	13	862,1	2	86	63	1015,0
3	34	14	865,1	3	89	64	1018,0
4	37	15	868,1	4	92	65	1021,1
5	41	16	871,2	5	96	66	1024,1
6	44	17	874,2	6	99	67	1027,2
7	47	18	877,3	7	12,02	68	1031,2
8	50	19	880,3	8	05	69	1032,2
9	53	20	883,3	9	08	70	1035,3
32,0	56	21	886,4	37,0	11	70	1036,3
1	59	22	889,4	1	14	71	1039,3
2	62	23	893,5	2	17	72	1042,4
3	65	24	896,5	3	20	73	1045,4
4	68	25	899,5	4	23	74	1048,4
5	72	26	902,5	5	26	75	1051,5
6	75	27	905,6	6	29	76	1054,5
7	78	28	908,7	7	32	77	1057,6
8	81	29	911,7	8	35	78	1060,6
9	84	30	914,7	9	38	79	1063,6

1	2	3	4	5	6	7	8
38,0	41	80	1066,7	43,0	92	29	1215,6
1	44	81	1069,7	1	95	30	1218,6
2	47	82	1072,8	2	98	31	1221,7
3	50	83	1075,8	3	14,01	32	1224,7
4	53	84	1078,8	4	04	33	1227,8
5	57	85	1081,9	5	08	34	1230,8
6	60	86	1084,9	6	11	35	1234,8
7	63	87	1088,0	7	14	36	1237,9
8	66	88	1091,0	8	17	37	1240,9
9	69	89	1094,0	9	20	38	1244,9
39,0	72	90	1097,1	44,0	23	39	1249,0
1	75	91	1100,1	1	26	40	1253,1
2	78	92	1103,2	2	29	41	1257,1
3	81	93	1106,2	3	32	42	1260,2
4	84	94	1109,2	4	35	43	1264,2
5	87	95	1112,3	5	38	44	1267,3
6	90	96	1114,3	6	40	45	1270,3
7	93	97	1117,3	7	43	46	1273,3
8	96	98	1120,4	8	46	47	1276,4
9	99	99	1123,4	9	49	48	1280,4
40,0	13,02	0,400	1126,5	45,0	52	49	1283,5
1	05	01	1129,5	1	55	49	1287,5
2	08	02	1132,5	2	58	50	1290,6
3	11	03	1135,6	3	61	51	1291,7
4	14	04	1138,6	4	64	52	1292,6
5	17	05	1141,6	5	67	53	1296,6
6	20	06	1144,7	6	70	54	1299,7
7	23	07	1147,7	7	73	55	1304,7
8	26	07	1149,7	8	76	56	1305,8
9	29	08	1152,8	9	79	57	1308,8
41,0	32	09	1155,8	46,0	82	58	1311,8
1	35	10	1158,9	1	85	59	1314,9
2	38	11	1161,9	2	88	60	1317,9
3	41	12	1164,9	3	91	61	1322,0
4	44	13	1168,0	4	94	62	1325,0
5	47	14	1170,0	5	97	63	1328,0
6	50	15	1174,1	6	15,00	64	1331,1
7	53	16	1176,1	7	03	65	1334,1
8	56	17	1179,1	8	06	66	1337,2
9	59	18	1182,2	9	09	67	1341,2
42,0	62	19	1185,2	47,0	12	68	1345,3
1	65	20	1188,2	1	15	69	1349,3
2	68	21	1190,3	2	18	70	1352,4
3	71	22	1194,8	3	21	71	1355,4
4	74	23	1197,4	4	24	72	1359,4
5	77	24	1200,4	5	27	73	1362,5
6	80	25	1203,4	6	29	74	1365,5
7	83	26	1206,5	7	32	75	1368,6
8	86	27	1209,5	8	35	76	1371,6
9	89	28	1212,6	9	38	77	1374,6

1	2	3	4	5	6	7	8
48,0	41	78	1377,7	53,0	87	26	1533,7
1	44	79	1380,7	1	90	27	1535,7
2	47	80	1383,8	2	93	28	1541,8
3	50	81	1387,8	3	96	29	1544,8
4	53	82	1390,8	4	99	30	1548,9
5	56	83	1395,9	5	17,02	31	1551,9
6	59	84	1396,9	6	04	32	1554,9
7	62	85	1400,0	7	07	33	1557,9
8	65	86	1403,0	8	10	34	1561,0
9	68	87	1406,0	9	13	35	1564,1
49,0	71	88	1409,1	54,0	16	36	1563,1
1	74	89	1411,1	1	19	37	1571,2
2	77	90	1415,2	2	22	38	1573,2
3	80	91	1418,2	3	24	38	1574,2
4	83	92	1420,2	4	27	39	1578,2
5	86	93	1425,3	5	30	40	1581,3
6	88	94	1428,3	6	33	41	1584,3
7	91	95	1431,4	7	36	42	1588,4
8	94	95	1434,4	8	38	43	1591,4
9	97	96	1437,4	9	41	44	1594,5
50,0	16,00	97	1440,5	55,0	44	45	1598,5
1	03	98	1443,5	1	47	46	1601,5
2	06	99	1446,6	2	50	47	1604,6
3	09	0,500	1449,6	3	53	48	1608,6
4	12	01	1453,6	4	56	49	1611,7
5	15	02	1456,7	5	59	50	1614,7
6	17	03	1459,7	6	61	51	1618,8
7	20	04	1462,8	7	64	52	1622,8
8	23	05	1465,8	8	67	53	1626,9
9	26	06	1468,8	9	70	54	1631,9
51,0	29	07	1471,9	56,0	73	55	1634,9
1	32	08	1474,9	1	76	55	1636,0
2	35	09	1477,9	2	79	56	1640,0
3	38	10	1481,0	3	81	57	1643,1
4	41	11	1484,0	4	84	58	1646,1
5	44	12	1487,1	5	87	59	1650,2
6	46	13	1490,1	6	90	60	1653,2
7	49	14	1493,2	7	93	61	1657,3
8	52	14	1495,2	8	95	62	1661,3
9	55	15	1497,2	9	98	63	1665,4
52,0	58	16	1500,2	57,0	18,01	64	1668,4
1	61	17	1503,3	1	04	65	1672,4
2	64	18	1506,3	2	07	66	1675,5
3	67	19	1509,4	3	10	67	1679,5
4	70	20	1512,4	4	13	68	1683,6
5	73	21	1515,4	5	16	69	1687,6
6	75	22	1519,5	6	18	70	1690,7
7	78	23	1522,5	7	21	71	1694,7
8	81	24	1525,6	8	24	72	1698,8
9	84	25	1529,6	9	27	73	1700,8

Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8
58,0	30	74	1704,9	4	26	07	1830,5
1	33	75	1708,9	5	29	07	1830,5
2	36	76	1712,9	6	32	08	1833,5
3	39	77	1717,0	7	35	09	1836,6
4	41	78	1721,1	8	37	10	1840,6
5	44	79	1724,1	9	40	11	1843,7
6	47	79	1725,1	62,0	43	12	1846,7
7	50	80	1729,2	1	46	13	1849,7
8	52	81	1732,2	2	49	14	1852,8
9	55	82	1735,2	3	51	15	1856,8
59,0	58	83	1739,3	4	54	16	1860,9
1	61	84	1743,3	5	57	17	1863,9
2	64	85	1747,4	6	60	18	1867,9
3	66	86	1751,4	7	63	19	1872,0
4	69	87	1755,5	8	65	20	1875,1
5	72	88	1759,6	9	68	21	1879,1
6	75	89	1762,6	63,0	71	22	1883,2
7	78	90	1765,6	1	74	23	1886,2
8	80	91	1769,7	2	77	24	1890,2
9	83	92	1773,7	3	79	25	1893,2
60,0	86	93	1766,7	4	82	26	1896,3
1	89	94	1780,8	5	85	27	1900,4
2	92	95	1784,9	6	88	28	1904,4
3	95	96	1788,0	7	91	29	1907,5
4	98	97	1791,0	8	93	30	1911,5
5	19,01	98	1796,0	9	96	31	1915,6
6	03	99	1800,1	64,0	99	32	1918,6
7	06	0,600	1804,1	1	20,02	33	1921,7
8	09	01	1807,2	2	04	33	1923,7
9	12	02	1810,2	3	07	34	1926,7
61,0	15	03	1818,3	4	10	35	1929,8
1	18	04	1822,4	5	13	36	1933,8
2	21	05	1826,5	6	15	37	1937,9
3	23	06	1829,5	7	18	38	1940,9

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ ДЛЯ УГЛУБЛЕННОГО ИЗУЧЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ РАЗДЕЛОВ КУРСА ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Общие вопросы

Биологический энциклопедический словарь.— М.: Советская энциклопедия, 1986.— 831 с.

Гродзинский А. М., Гродзинский Д. М. Краткий справочник по физиологии растений.— Киев.: Наук. думка, 1973.— 591 с.

Гродзинский Д. М. Надежность растительных систем.— Киев.: Наук. думка, 1983.— 365 с.

Лархер В. Экология растений.— М.: Мир, 1978.— 382 с.

Новые направления в физиологии растений /Под ред. А. Л. Курсанова.— М.: Наука, 1985.— 286 с.

Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия.— М.: Просвещение, 1987.— 815 с.

Физиология плодовых растений /Под ред. Г. Фридрих, Д. Нойманн, М. Фогль.— М.: Колос, 1983.— 415 с.

Физиология сельскохозяйственных растений. В 12 т. /Под ред. Б. А. Рубина.— М.: МГУ, 1967.— 1971.

Эволюция функций в растительном мире /Под ред. В. В. Полевого, Ю. И. Маслова.— Л.: Изд-во ЛГУ, 1985.— 243 с.

Эзау К. Анатомия семенных растений. В 2 т.— М.: Мир, 1980.

Юсуфов А. Г. Лекции по эволюционной физиологии растений.— М.: Высшая школа, 1985.— 101 с.

Обзорные и экспериментальные статьи по различным вопросам физиологии растений публикуются в журналах: «Физиология растений» (АН СССР), «Физиология и биохимия культурных растений» (АН УССР), «Успехи современной биологии» (АН СССР), «Сельскохозяйственная биология» (ВАСХНИЛ), «Доклады АН СССР», «Доклады ВАСХНИЛ». Важнейшая мировая литература представлена в реферативном журнале «Физиология и биохимия растений» (отдельный выпуск сводного тома «Биология») и в критико-библиографическом журнале «Новые книги за рубежом» (серия В).

Физиология растительной клетки

Биотехнология. Принципы и применение.— М.: Мир, 1988.— 479 с.

Биотехнология сельскохозяйственных растений.— М.: Агропромиздат, 1987.— 301 с.

Болдырев А. А. Введение в биохимию мембран // Биохимия мембран: Учеб. пособие для биол. и мед. спец. вузов /Под ред. А. А. Болдырева.— М.: Высшая школа, 1986.— 112 с.

Браун А. Д., Моженко Т. П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы.— Л.: Наука, 1987.— 230 с.

Браунштейн А. Е. На стыке химии и биологии.— М.: Наука, 1987.— 239 с.

- Дж. Бил, Дж. Ноулз. Внеядерная наследственность: Пер. с англ./Под ред. и с предисл. Г. Г. Гаузе.— М.: Мир, 1981.— 167 с.
- Конарев В. Г. Белки растений как генетические маркеры.— М.: Колос, 1983.— 320 с.
- Культура клеток растений и биотехнология/Под ред. Р. Г. Бутенко.— М.: Наука, 1986.— 285 с.
- Саламатова Т. С. Физиология растительной клетки.— Л.: Изд-во ЛГУ, 1983.— 229 с.
- Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды.— М.: Мир, 1987.— 410 с.
- Трузян Э. С. Основы генетической инженерии растений.— М.: Наука, 1988.— 302 с.
- Ясус Кагава. Биомембраны.— М.: Высшая школа, 1985.— 301 с.

Электрофизиология

- Галактионов С. Г., Юрин В. М. Ботаника с гальванометром.— М.: Знание, 1979.— 141 с.
- Маслоброд С. Н. Электрический «язык» растений.— Кишинев: Штиинца, 1981.— 135 с.

Водный обмен

- Биологические и агрономические основы орошаемого земледелия/Под ред. В. П. Иванова.— М.: Наука, 1983.— 269 с.
- Букин В. И., Иванов В. П., Тарковский М. И. Физиология орошаемой люцерны.— М.: Колос, 1984.— 154 с.
- Водный и энергетический обмен растений/Под ред. И. А. Тарчевского. Казань: Изд-во КГУ, 1985.— 88 с.
- Водный режим растений в связи с различными экологическими условиями.— Казань: КГУ, 1978.— 391 с.
- Голченко М. Г., Девятков А. С., Лагун Т. Д. Орошение садов и ягодников.— Минск: Ураджай, 1985.— 190 с.
- Водный обмен растений/В. Н. Жолкевич, Н. А. Гусев, А. В. Капля и др.— М.: Наука, 1989.— 256 с.
- Кружилин А. С. Биологические особенности и продуктивность орошаемых культур.— М.: Колос, 1977.— 301 с.
- Кушниренко М. Д., Курчатова Г. П. Диагностика сроков влагозарядочных поливов по показателям электрического сопротивления тканей побегов.— Кишинев: Штиинца, 1987.— 26 с.
- Легенченко Б. И., Романовский Ч. А. Физиология и продуктивность растений при импульсном дождевании.— Минск: Наука и техника, 1985.— 168 с.
- Максимов Н. А. Избранные работы по засухоустойчивости и зимостойкости растений.— М.: Изд-во АН СССР, 1952. Т. 1. Водный режим и засухоустойчивость растений.— 576 с.
- Ткачук Е. С. Физиология водопотребления при оптимизации минерального питания растений.— Киев: Наук. думка, 1986.— 166 с.
- Филиппов Л. А. Водный режим растений и диагностика полива.— Новосибирск: Наука, 1982.— 151 с.

Фотосинтез

- Избранные главы физиологии растений/В. Ф. Гавриленко, М. В. Гусев, К. А. Никитина и др.— М.: Изд-во МГУ, 1986.— 440 с.
- Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. Т. 3. Теоретические основы повышения продуктивности растений/Под ред. А. А. Ничипорович.— М.: ВИНТИ, 1977.— 133 с.

Курсанов А. Л. Транспорт ассимилятов в растениях.— М.: Наука, 1976.— 646 с.

Мокронос А. Т. Онтогенетический аспект фотосинтеза.— М.: Наука, 1981.— 195 с.

Лисовский Г. М., Долгушев В. А. Очерки частной светокультуры растений.— Новосибирск: Наука, 1986.— 127 с.

Фотосинтез. В 2 т./Под ред. Говинджи.— М.: Мир, 1987. Т. 1.— 727 с., Т. 2.— 469 с.

Фотосинтез и биопродуктивность: методы определения/Под ред. А. Т. Мокроносова, А. Г. Ковалева.— М.: Агропромиздат, 1989.— 459 с.

Чиков В. И. Фотосинтез и транспорт ассимилятов.— М.: Наука, 1987.— 185 с.

Эварс Дж., Уокер Д. Фотосинтез C_3 и C_4 растений: механизмы и регуляция.— М.: Мир, 1986.— 598 с.

Дыхание

Гордон Л. Х. Дыхание и водно-солевой обмен растительной ткани.— М.: Наука, 1976.— 119 с.

Гринова Г. М. Регуляция метаболизма у растений при недостатке кислорода.— М.: Наука, 1975.— 279 с.

Глиоксилатный цикл растений. А. А. Землянухин, Л. А. Землянухин, А. Т. Епринцев, А. У. Игамбердиев.— Воронеж: Изд-во Воронежского ун-та, 1986.— 146 с.

Куперман И. А., Хитрово Е. В. Дыхательный газообмен как элемент продукционного процесса растений.— Новосибирск: Наука, 1977.— 183 с.

Скулачев В. П. Биоэнергетика. Мембранные преобразования энергии.— М.: Высшая школа, 1989.— 271 с.

Минеральное питание

Журбицкий З. И. Теория и практика вегетационного метода.— М.: Наука, 1968.— 263 с.

Кретович В. Л. Усвоение и метаболизм азота у растений.— М.: Наука, 1987.— 485 с.

Лютгге У., Хигинботам Н. Передвижение веществ в растениях.— М.: Колос, 1984.— 407 с.

Мосолов И. В. Физиологические основы применения минеральных удобрений.— М.: Колос, 1979.— 255 с.

Сабинин Д. А. Избранные труды по минеральному питанию растений.— М.: Наука, 1971.— 511 с.

Хавкин Э. Е. Диагностика азотного питания сельскохозяйственных растений.— М.: ВАСХНИЛ, 1984.— 61 с.

Школьник М. Я. Микроэлементы в жизни растений.— Л.: Наука, 1974.— 324 с.

Обмен веществ

Брей С. М. Азотный обмен в растениях.— М.: Агропромиздат, 1986.— 199 с.

Бэртон У. Г. Физиология созревания и хранения продовольственных культур.— М.: Агропромиздат, 1985.— 359 с.

Измайлов С. Ф. Азотный обмен в растениях.— М.: Наука, 1986.— 319 с.

Казаков Е. Д., Кретович В. Л. Биохимия зерна и продуктов его переработки.— М.: Колос, 1980.— 319 с.

Метлицкий Л. В. Основы биохимии плодов и овощей.— М.: Экономика, 1976.— 349 с.

Мусил Я., Новикова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах.— М.: Мир, 1981.— 215 с.

Павлов А. Н. Повышение содержания белка в зерне.— М.: Наука, 1984.— 119 с.

Соболев А. М. Запасание белка в семенах растений.— М.: Наука, 1985.— 112 с.

Рост и развитие

Анализ динамики роста биологических объектов/Под ред. И. А. Терскова.— М.: Наука, 1987.— 127 с.

Батыгин Н. Ф. Онтогенез высших растений.— М.: Агропромиздат, 1986.— 99 с.

Бернье Ж., Кине Ж.-М., Сакс Р. М. Физиология цветения. В 2 т. Т. 1. Факторы цветения/Пер. с англ. Л. В. Ковалевой и В. З. Подольного; Под ред. и с предисл. Н. П. Аксеновой и Т. Н. Константиновой.— М.: Агропромиздат, 1985.— 192 с.

Бернье Ж., Кине Ж.-М., Сакс Р. М. Физиология цветения. В 2 т. Т. 2. Переход к репродуктивному развитию/Пер. с англ. Л. В. Ковалевой, Э. Л. Миляевой и В. З. Подольного; Под ред. и с предисл. Н. П. Аксеновой и Т. Н. Константиновой.— М.: Агропромиздат, 1985.— 317 с.

Биология развития культурных растений: Учеб. пособие для вузов/Ф. М. Куперман, Е. И. Ржанова, Е. В. Мурашов и др.; Под ред. Ф. М. Куперман.— М.: Высшая школа, 1982.— 343 с.

Биохимия иммунитета, покоя, старения растений/Под ред. И. В. Березина.— М.: Наука, 1984.— 263 с.

Головкин Э. А. Микроорганизмы в аллелопатии высших растений.— Киев: Наук. думка, 1984.— 199 с.

Кефели В. И. Рост растений.— М.: Колос, 1984.— 175 с.

Кефели В. И., Прусакова Л. Д. Химические регуляторы растений.— М.: Знание, 1985.— 63 с.

Кумаков В. А. Физиологическое обоснование моделей сортов пшеницы.— М.: Агропромиздат, 1985.— 270 с.

Куперман Ф. М. Морфофизиология растений.— М.: Высшая школа, 1977.— 287 с.

Мошков Б. С. Актиноритмизм растений.— М.: Агропромиздат, 1987.— 272 с.

Райс Э. Аллелопатия. М.: Мир, 1978.— 392 с.

Полевой В. В. Фитогормоны.— Л.: Изд-во ЛГУ, 1982.— 248 с.

Роль фитохрома в растениях/Кузнецов Е. Д., Сечняк Л. Д., Киндрук Н. А. и др.— М.: Агропромиздат, 1986.— 288 с.

Терминология роста и развития растений/Под ред. М. Х. Чайлахяна.— М.: Наука, 1982.— 95 с.

Уоринг Ф., Филлипс И. Рост растений и дифференцировка.— М.: Мир, 1984.— 511 с.

Чайлахян М. Х. Регуляция цветения высших растений.— М.: Наука, 1988.— 558 с.

Чайлахян М. Х. Фотопериодическая и гормональная регуляция клубнеобразования у растений.— М.: Наука, 1986.— 68 с.

Чайлахян М. Х., Хрянин В. Н. Пол растений и его гормональная регуляция.— М.: Наука, 1982.— 172 с.

Шевелуха В. С. Периодичность роста сельскохозяйственных растений и его регулирования.— М.: Колос, 1980.— 455 с.

Устойчивость к неблагоприятным условиям

Айзенман Б. Е., Смирнов В. В., Бондаренко А. С. Фитонциды и антибиотики высших растений.— Киев: Наук. думка, 1984.— 275 с.

Газоустойчивость растений/Под ред. В. С. Николаевского.— Новосибирск: Наука, 1980.— 243 с.

Генкель П. А. Физиология жаро- и засухоустойчивости растений.— М.: Наука, 1982.— 279 с.

Гудернан Р. Г. Загрязнение воздушной среды.— М.: Мир, 1979.— 197 с.

Деверолл Б. Дж. Защитные механизмы растений.— М.: Колос, 1980.— 127 с.

Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям: методическое руководство/Под ред. Г. В. Удовенко.— Л.: ВИР, 1988.— 227 с.

Дроздов С. Н. Терморезистентность активно вегетирующих растений.— Л.: Наука, 1984.— 168 с.

Загрязнение воздуха и жизнь растений/Под ред. Майкла Трепоу.— Л.: Гидрометеониздат, 1988.— 534 с.

Коровин А. И. Растения и экстремальные условия.— Л.: Гидрометеониздат, 1984.— 271 с.

Курсанова Т. А. Развитие представлений о природе иммунитета растений.— М.: Наука, 1988.— 98 с.

Райс Э. Природные средства защиты растений от вредителей.— М.: Мир, 1986.— 179 с.

Растения в экстремальных условиях минерального питания: Эколого-физиологические исследования/Под ред. М. Я. Школьниковой, Н. В. Алексеевой-Поповой.— Л.: Наука, 1983.— 176 с.

Тумапов И. И. Физиология закаливания и морозостойкости растений.— М.: Наука, 1979.— 349 с.

Устойчивость растений к водному и температурному стрессам/Шматько И. Г., Григорюк И. А., Шведова О. Е.; Под ред. И. Г. Шматько.— Киев: Наук. думка, 1989.— 224 с.

Экспресс-методы диагностики жаро-, засухоустойчивости и сроков полива растений.— Кишинев: Штинца, 1986.— 36 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Глава 1

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

(Т. В. Карнаухова)	3
Работа 1. Влияние анионов и катионов солей на форму и время плазмолиза	6
Работа 2. Наблюдение колпачкового плазмолиза	7
Работа 3. Наблюдение признаков повреждения клетки (повышение сродства к красителям и оструктуривание ядра и цитоплазмы)	7
Работа 4. Диагностика повреждения растительной ткани по увеличению ее проницаемости	8
Работа 5. Определение жизнеспособности семян по окрашиванию цитоплазмы	10
Работа 6. Определение изоэлектрической точки растительных тканей колориметрическим методом	11
Работа 7. Наблюдение действия света на скорость движения цитоплазмы	13
Работа 8. Определение потенциального осмотического давления клеточного сока методом плазмолиза	15
Работа 9. Определение концентрации клеточного сока и потенциального осмотического давления рефрактометрическим методом	17
Работа 10. Определение водного потенциала растительной ткани методом полосок по Лилленштерн	18
Работа 11. Определение водного потенциала листьев методом Шардакова	19
Работа 12. Определение водного потенциала растительной ткани рефрактометрическим методом по Максиму-ву и Петинову	20

Глава 2

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЯ

(Л. А. Паничкин)	21
Работа 13. Определение градиентов биопотенциалов между зонами корня и их зависимость от ионного состава среды	26
Работа 14. Установление зависимости биопотенциалов клеток корня от температуры	28
Работа 15. Определение разности биопотенциалов между поврежденными и неповрежденными участками ткани растения	31
Работа 16. Наблюдение светоиндуцированных изменений разности потенциалов фотосинтезирующих клеток	32
Работа 17. Определение биопотенциалов действия у отрезков стебля подсолнечника	33

Работа 18. Наблюдение специфичности биоэлектрических реакций растений	35
Работа 19. Определение электрической проводимости поврежденных и здоровых клубней картофеля	36
Работа 20. Определение зависимости электрической проводимости тканей листа пшеницы от условий минерального питания и водного режима	37

Глава 3

ВОДНЫЙ ОБМЕН

(Н. В. Пильщикова)	39
Работа 21. Определение содержания воды и сухого вещества в растительном материале	40
Работа 22. Влияние температуры на скорость и движущую силу выделения пасоки	43
Работа 23. Влияние препаратов группы 2,4-Д на нагнетательную деятельность корневой системы растений	47
Работа 24. Сравнение транспирации верхней и нижней сторон листа хлоркобальтовым методом по Штально	50
Работа 25. Определение интенсивности транспирации и относительной транспирации при помощи технических весов	51
Работа 26. Определение интенсивности транспирации у срезаемых листьев при помощи торзионных весов по Иванову	54
Работа 27. Определение интенсивности транспирации при помощи электронного транспиометра конструкции А. П. Ваганова	56
Работа 28. Наблюдение за перераспределением калия при движении устьиц	58
Работа 29. Определение состояния устьиц методом инфильтрации по Молищу	60
Работа 30. Определение степени раскрытия устьиц на фиксированном эпидермисе по Ллойдю	61
Работа 31. Изучение состояния устьиц методом отпечатков по Полаччи	63
Работа 32. Определение водного дефицита растений	64
Работа 33. Определение водоудерживающей способности растений методом «завядания» по Арланду	67
Работа 34. Определение продуктивности транспирации и транспирационного коэффициента	68
Работа 35. Влияние влажности корнеобитаемой среды на водообмен и рост растений	70

Глава 4

ФОТОСИНТЕЗ

(В. Г. Земский)	73
Работа 36. Определение химических свойств пигментов листа	75
Работа 37. Наблюдение оптических свойств пигментов	80
Работа 38. Фотосенсибилизирующее действие хлорофилла на реакцию переноса водорода по Гуревичу	83
Работа 39. Количественное определение пигментов	86
Работа 40. Разделение пигментов листа хроматографическим методом по Цвету	94

Работа 41. Определение содержания пигментов в листьях методом бумажной хроматографии	98
Работа 42. Определение интенсивности фотосинтеза по поглощению CO_2 в токе воздуха	103
Работа 43. Фотоколориметрический метод определения содержания углерода в листьях мокрым сжиганием в хромовой смеси по Х. К. Аликову	109
Работа 44. Определение чистой продуктивности фотосинтеза	113
Работа 45. Определение площади листьев	116

Глава 5

ДЫХАНИЕ

(Л. В. Можаява)	119
Работа 46. Обнаружение дегидрогеназ в растении по восстановлению динитробензола	121
Работа 47. Определение активности дегидрогеназ методом вакуум-инфильтрации по Пыльневу	122
Работа 48. Обнаружение пероксидазы и определение ее активности	124
Работа 49. Определение активности ортодифенолоксидазы по Бояркину	127
Работа 50. Определение активности каталазы в растительных объектах	128
Работа 51. Определение содержания аскорбиновой кислоты, глутатиона и общей редуцирующей активности растительной ткани методом Петта в модификации Прокошева	130
Работа 52. Наблюдение за действием динитрофенола на поступление воды в ткань клубня картофеля	133
Работа 53. Определение интенсивности дыхания семян в закрытом сосуде	134
Работа 54. Определение интенсивности дыхания прорастающих семян в токе воздуха	135
Работа 55. Определение дыхательного коэффициента прорастающих семян	137
Работа 56. Определение интенсивности дыхания и дыхательного коэффициента при помощи прибора Варбурга	139

Глава 6

МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ

(А. Е. Петров-Спиридонов, Я. М. Геллерман)	149
Работа 57. Влияние отдельных элементов питательной смеси на рост растений	154
Работа 58. Смещение pH питательного раствора корневой системой растений	158
Работа 59. Рост корней пшеницы в растворе чистой соли и смеси солей (антагонизм ионов)	159
Работа 60. Определение объема корневой системы методом Сабинина и Колосова	160
Работа 61. Определение общей и рабочей адсорбирующей поверхности корневой системы методом Сабинина и Колосова	163
Работа 62. Определение зависимости поглощения ионов от метаболической активности корневых систем	165

Работа 63. Влияние источников азотного питания и молибдена на нитратредуктазную активность тканей растения	169
--	-----

Глава 7

ОБМЕН ВЕЩЕСТВ

(М. И. Кондратьев)	173
Работа 64. Определение содержания суммарных белков	175
Работа 65. Определение активности протеиназ в прорастающих семенах	180
Работа 66. Определение запасного крахмала в семенах по Починку	185
Работа 67. Определение активности амилаз в прорастающих семенах	188
Работа 68. Определение содержания жиров рефрактометрическим методом	191
Работа 69. Определение активности липаз в процессе прорастания семян	193

Глава 8

РОСТ И РАЗВИТИЕ

(М. И. Калинин, Е. Е. Крастина)	195
Работа 70. Определение зон роста в органах растений	197
Работа 71. Наблюдение за ростом при помощи горизонтального микроскопа	199
Работа 72. Наблюдение периодичности роста древесных побегов	200
Работа 73. Изучение действия гетероауксина на рост корней	200
Работа 74. Изучение влияния гетероауксина на укоренение черенков фасоли	201
Работа 75. Прерывание периода покоя у клубней картофеля при помощи тиомочевины	202
Работа 76. Наблюдение избирательного (селективного) действия гербицидов группы 2,4-Д	203
Работа 77. Наблюдение за нарушением геотропизма корней под действием эозина	204
Работа 78. Наблюдение эпинастических и гипонастических изгибов листьев под влиянием гетероауксина	205
Работа 79. Изучение воздействия на рост междоузлий стебля карликового гороха гибберелловой кислоты	206
Работа 80. Выявление апикального доминирования у гороха	207
Работа 81. Наблюдение ярусной изменчивости морфологических признаков	208
Работа 82. Установление фотопериодической реакции горчицы белой	209
Работа 83. Наблюдение влияния фитохрома на прорастание семян салата	210
Работа 84. Определение силы роста семян методом морфофизиологической оценки проростков	211

Глава 9

УСТОЙЧИВОСТЬ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ УСЛОВИЯМ

(Н. Н. Третьяков, К. И. Каменская)	213
Работа 85. Выявление защитного действия сахаров на протоплазму	215

Работа 86.	Изучение действия сахара на белки протоплазмы при отрицательных температурах	217
Работа 87.	Способ закаливания и определения морозоустойчивости озимых злаков с использованием экзогенных сахаров	217
Работа 88.	Определение жизнеспособности озимых зерновых культур в зимний период методом монолитов	218
Работа 89.	Определение состояния озимых зерновых культур по отрастанию в воде	220
Работа 90.	Определение состояния озимых культур ускоренным методом	221
Работа 91.	Оценка состояния озимых зерновых культур по конусу нарастания	223
Работа 92.	Определение жизнеспособности озимых зерновых культур окрашиванием тканей	224
Работа 93.	Оценка жизнеспособности растений после перезимовки по состоянию корневой системы	227
Работа 94.	Диагностика устойчивости озимых культур к физиологическому выпреванию	228
Работа 95.	Определение степени закаливания озимых зерновых культур	229
Работа 96.	Определение морозоустойчивости растений на проростках	230
Работа 97.	Оценка холодостойкости кукурузы на первых этапах роста и развития	231
Работа 98.	Определение морозоустойчивости по степени проницаемости протоплазмы для электролитов	232
Работа 99.	Вегетационный метод оценки устойчивости растений к вымоканию	233
Работа 100.	Ранняя диагностика устойчивости растений к вымоканию	234
Работа 101.	Определение вязкости протоплазмы клеток растений сортов, различающихся по жаростойкости	234
Работа 102.	Определение устойчивости растений к экстремальным воздействиям по степени повреждения хлорофиллоносных тканей	235
Работа 103.	Определение температурного порога коагуляции цитоплазмы	236
Работа 104.	Определение водоудерживающей способности растений	237
Работа 105.	Определение засухоустойчивости растений проращиванием семян на растворах сахарозы	238
Работа 106.	Определение засухоустойчивости растений по содержанию прочносвязанной фракции хлорофилла <i>a</i> и <i>b</i>	238
Работа 107.	Диагностика засухоустойчивости и жаростойкости растений по изменению содержания статолитного крахмала	240
Работа 108.	Определение засухоустойчивости растений методом крахмальной пробы	242
Работа 109.	Биоэлектрическая реакция растений, различающихся по засухоустойчивости	243

Работа 110. Определение жаростойкости культур по сопротивлению их тканей электрическому току . . .	244
Работа 111. Оценка засухоустойчивости растений ауксаногрифическим методом по Шевслухе	245
Работа 112. Определение жизнеспособности древесных растений электрофизиологическим методом	247
Работа 113. Определение жизнеспособности пыльцы по Шардакову	248
Работа 114. Определение устойчивости зерновых злаковых культур к токсичности кислых почв	249
Работа 115. Определение солеустойчивости злаков по ростовым процессам	250
Работа 116. Определение солеустойчивости растений по количеству альбуминов в зеленых листьях	251
Работа 117. Определение солеустойчивости растений по степени выцветания хлорофилла по Генкелю	251
Работа 118. Определение устойчивости зерновых культур к полеганию по анатомическому строению стебля	252
<i>Приложение</i>	254
<i>Библиографический указатель литературы для углубленного изучения отдельных разделов курса физиологии растений . .</i>	261

Учебное издание

**ПРАКТИКУМ
ПО ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

Зав. редакцией *И. П. Незговорова*
Художественный редактор *Е. Г. Прибегина*
Технический редактор *Т. Б. Платонова*
Корректор *И. А. Верхотурова*

ИБ № 6695

Сдано в набор 24.01.90. Подписано к печати 02.07.90. Формат 84×108¹/₃₂. Бумага тип. № 2. Гарнитура Литературная. Печать высокая. Усл. печ. л. 14,28. Усл. кр.-отт. 14,28. Уч.-изд. л. 15,3. Изд. № 232. Тираж 20 500 экз. Заказ № 1561. Цена 80 коп.

Ордена Трудового Красного Знамени ВО «Агропромиздат», 107807, ГСП-6, Москва, Б-78, ул. Садовая-Спасская, 18.

Областная типография издательств, полиграфии и книжной торговли Ивановского облисполкома, 153628, г. Иваново, ул. Типографская, 6.